

**Die Bedeutung  
des JAK/STAT-Signalweges für die  
Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

eingereicht beim Fachbereich Biowissenschaften (15)  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Daniela Baus  
Dipl.-Ing. Biotechnologie  
aus Saarbrücken

Frankfurt am Main 2005  
D30

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität,  
Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. H. Osiewacz
Gutachter:	Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz
	Dr. habil. E. Pfitzner

Datum der Disputation:

### **Eidesstattliche Erklärung**

Die selbstständige Anfertigung dieser Arbeit erkläre ich an Eides statt.

Frankfurt am Main, den 21. September 2005.

(Daniela Baus)

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.1 Die Entstehung von Krebs	1
1.2 Das klassische Hodgkin-Lymphom	3
1.3 Die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade	8
1.4 Die STAT-Familie	10
1.5 STAT1	12
1.6 STAT3	13
1.7 STAT5	14
1.8 STAT6	15
1.9 Negativregulatoren der JAK/STAT-Signalkaskade	17
1.10 Inhibition der JAK/STAT-Signalkaskade als Ansatzpunkt für Krebstherapien	20
1.10.1 Nicht-sequenz-spezifische Inhibition	20
1.10.2 Sequenz-spezifische Inhibition	21
1.10.3 Therapeutische Ansätze zur Behandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms	23
1.11 Zielsetzung	24

## 2 Material und Methoden

2.1 Material	26
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.2 Chemikalien	26
2.1.3 Lösungen	27
2.1.4 Kits und Standards	28
2.1.5 Zellkulturreagenzien	28
2.1.6 Antikörper	29
2.1.7 Zellen	30
2.1.8 Bakterien	31
2.1.9 Plasmide	31
2.1.10 Oligonukleotide	32
2.2 Klonierungsstrategie für siRNAs (small interfering RNAs) im lentiviralen Vektor pVIG	33
2.3 Klonierung von SOCS1 und SOCS3 in den retroviralen Vektor pMX-IRES- LNGFR	34
2.4 Klonierung von SOCS3 in den lentiviralen Vektor pVIG-IRES	36
2.5 Methoden	37
2.5.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur	37
2.5.1.1 Zellzahlbestimmung mittels COULTER COUNTER	37
2.5.1.2 Passagieren von Zellen	37
2.5.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
2.5.1.4 Transiente Transfektion von Zellen mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation zur Produktion von Viruspartikeln	38
2.5.1.5 Transduktion von Zellen	39
2.5.1.6 Titerbestimmung	39
2.5.1.7 FACS (Fluorescence aquired cell sorting)-Analyse	40
2.5.1.8 Vitalitätsbestimmung von Zellen	40
2.5.1.9 Zellzyklusbestimmung	42
2.5.2 Proteinbiochemische Methoden	42
2.5.2.1 RIPA-Zellextrakte	42
2.5.2.2 Detergenz-freie Gesamtzellextrakte (WCE)	43
2.5.2.3 Kalorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford	43
2.5.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	44
2.5.2.5 Western-Blot und Immunodetektion	45
2.5.2.6 Entfernen gebundener Antikörper (Strippen) von Membranen	46
2.5.2.7 Gelretardierungsanalyse (EMSA)	46



2.5.2.8 Immunhistochemische Färbungen von HL-Biopsien	47
2.5.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren und Klonierungstechniken	48
2.5.3.1 Präparation chemokompetenter Bakterien	48
2.5.3.2 Transformation von Bakterien	48
2.5.3.3 Analytische Plasmidisolierung (Mini-Präparation)	49
2.5.3.4 Präparative Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)	49
2.5.3.5 Natriumacetat-Fällung von DNA	49
2.5.3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA	50
2.5.3.7 Restriktionsverdau mit Endonukleasen	50
2.5.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.5.3.9 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (CIP)	50
2.5.3.10 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	51
2.5.3.11 Auffüllen von 3'-Enden von DNA-Fragmenten mittels Klenow	51
2.5.3.12 Hybridisierung von komplementären einzelsträngigen DNAs	51
2.5.3.13 Agarose-Gelelektrophorese	52
2.5.3.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	52
2.5.3.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
2.5.3.16 RNA-Isolation aus Säugerzellen	53
2.5.3.17 Konzentrationsbestimmung von RNA	53
2.5.3.18 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)	53
2.5.3.19 Quantitative RT-PCR (iCycler iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System)	54
2.5.3.20 Auswertung der Real-Time PCR	54
2.5.3.21 Microarray-Analyse	55

### 3 Ergebnisse

3.1 Die Bedeutung der STAT-Proteine für das klassische Hodgkin-Lymphom	56
3.1.1 Aktivierungsmuster von STAT-Proteinen in verschiedenen Zelllinien des klassischen Hodgkin-Lymphoms	56
3.1.2 Hemmung der STAT-Aktivierung mit Hilfe von synthetischen Inhibitoren	61
3.1.2.1 Einfluss von AG490 und Cucurbitacin I auf die Proliferation von HL-Zelllinien	64
3.1.2.2 Einfluss von AG490 und Cucurbitacin I auf den Zellzyklus von HL-Zelllinien	66
3.1.3 Expression von siRNA gegen STAT3 in HL-Zelllinien	68
3.1.3.1 Effekt der STAT3-siRNA auf die Proliferation von L1236-Zellen	71
3.1.3.2 Einfluss der STAT3-siRNA auf den Zellzyklus von L1236-Zellen	72
3.1.4 Expression einer STAT6-siRNA in HL-Zelllinien	74
3.1.4.1 Einfluss von STAT6-siRNA auf die Proliferation von HL-Zelllinien	76
3.1.4.2 Einfluss der STAT6-siRNA auf den Zellzyklus von HL-Zelllinien	77
3.1.4.3 Die STAT6-siRNA induziert Apoptose in den L1236-Zellen	79
3.1.4.4 Microarray-Analyse mit STAT6-siRNA- exprimierenden L1236-Zellen	80
3.1.4.5 Validierung von potentiellen STAT6-Zielgenen in L1236-Zellen	84
3.2 Die Bedeutung von SOCS1 und SOCS3 im klassischen Hodgkin-Lymphom	85
3.2.1 Die Expression von SOCS1 und SOCS3 in HL-Zelllinien	85
3.2.2 Die Expression von SOCS1 und SOCS3 in HL-Biopsien	87
3.2.3 Einfluss von überexprimiertem SOCS1 und SOCS3 auf die STAT3-Aktivierung in HL-Zelllinien	89
3.2.4 Einfluss von überexprimiertem SOCS1 und SOCS3 auf die Proliferation von HL-Zelllinien	92

3.2.5 Expression von SOCS3 in einem lentiviralen System	93
3.2.6 Einfluss von überexprimiertem SOCS3 auf die Proliferation von HL-Zelllinien	95
3.2.7 Einfluss von SOCS3 auf den Zellzyklus von HL-Zelllinien	96
3.2.8 Einfluss von SOCS3 auf STAT6-Aktivierung von HL-Zelllinien	97
3.2.9 Einfluss von SOCS3 auf die Aktivität von NF $\kappa$ B	99
<b>4 Diskussion</b>	
4.1 Die Bedeutung der STAT-Proteine im klassischen Hodgkin-Lymphom	101
4.2 Einfluss von synthetischen Inhibitoren auf die JAK/STAT-Signalkaskade	104
4.3 Die Bedeutung von STAT3 in HL-Zelllinien	106
4.4 Die Bedeutung von STAT6 in HL-Zelllinien	108
4.5 Die Bedeutung von SOCS1 und SOCS3 im klassischen Hodgkin-Lymphom	111
<b>5 Zusammenfassung</b>	117
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	119
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	138
<b>8 Anhang</b>	140

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Entstehung von Krebs

Die normale Zellentwicklung unterliegt der strikten Regulierung einer Vielzahl von Prozessen. Grundvoraussetzung für die Entwicklung jedes Organismus ist die Koordination von Proliferation, Differenzierung und Apoptose jeder einzelnen Zelle eines Organismus. Um dies zu ermöglichen stehen den Zellen verschiedene Kommunikationswege zur Verfügung. Dazu gehören unter anderem Zell-Zellkontakt und sogenannte Signaltransduktionskaskaden, die im Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren. Solche Signaltransduktionskaskaden bilden in der Zelle komplexe Netzwerke und sind in der Lage auf äußere Einflüsse spezifisch zu reagieren. Extrazelluläre Signale sind in der Lage eine ruhende Zelle (quiescent) in einen aktiv proliferierenden Status zu versetzen. Signale in Form von Wachstumsfaktoren, Hormonen, extrazellulären Matrixkomponenten oder Zytokinen werden, z.B. durch Transmembranrezeptoren, weitergeleitet und induzieren so die gezielte transiente Expression von Genen. Entscheidend dabei ist das Gleichgewicht (Homöostase) zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose (programmierter Zelltod) in den Zellen. Krebszellen sind gekennzeichnet durch eine Störung dieses Gleichgewichtes. Als Resultat vermehrter Zellteilungen, sowie einer Störung der Apoptose, kann es zur Entstehung eines Tumors kommen. Die Ursache einer solchen Tumorentstehung ist höchstwahrscheinlich nicht auf ein einzelnes Ereignis zurückzuführen, sondern vielmehr die Summe (ca. sechs) verschiedener Vorkommnisse (Hanahan *et al.*, 2000). Dazu gehören physiologische Veränderungen, die Krebszellen unabhängig von extrazellulären Stimuli werden lassen. So kann durch Sekretion von Wachstumsfaktoren einer Zelle ermöglicht werden sich selbst mit proliferations-fördernden Botenstoffen zu versorgen (Hanahan *et al.*, 2000). Dabei können die wachstums-fördernden Stoffe sowohl von der eigentlichen Krebszelle selbst produziert werden (autokrin), als auch durch Nachbarzellen (Bystander-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen) bereitgestellt werden (parakrin). Des Weiteren kann eine Störung der Homöostase auf eine Überexpression von wachstumsfaktor-spezifischen

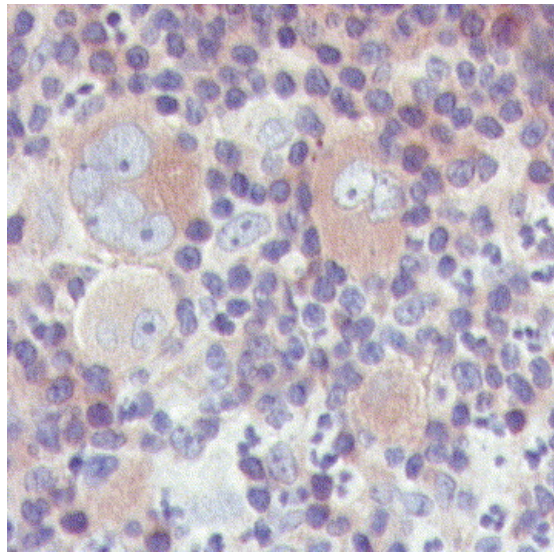
---

Rezeptoren zurückgehen. Solche Rezeptoren besitzen meist eine Tyrosinkinase-Aktivität in ihrer zytoplasmatischen Domäne und sind in der Lage verschiedene Stimuli weiterzuleiten. In verschiedenen Krebsarten wurden strukturelle Veränderungen solcher Rezeptoren, z.B. Verkürzungen oder Punktmutationen festgestellt, die eine unkontrollierte Signalübermittlung ermöglichen (Hanahan *et al.*, 2000). Solche Mutationen finden sich auch auf der Ebene von Transkriptionsfaktoren, die zum einen die Funktion eines Tumorsuppressors inaktivieren können oder ein Protoonkogen aktivieren können (Darnell, 1997). Eine weitere erworbene Fähigkeit von Krebszellen ist die Blockade von anti-proliferativen Signalen. Normalerweise zwingen solche Signale eine Zelle aus einem aktiven, proliferierenden Zustand in einen ruhenden Zustand (G0 Phase des Zellzyklus, quiescent). Dieser ruhende Zustand kann dann wieder durch extrazelluläre Signale aufgehoben werden. Ein zusätzliches wichtiges Merkmal von Krebszellen ist ihre Resistenz in Bezug auf den programmierten Zelltod (Apoptose). Diese Fähigkeit ist meist verbunden mit dem Verlust eines pro-apoptotischen Regulators, z.B. durch Mutation eines Tumorsuppressors (p53) (Harris, 1996). Zusammengefasst definieren diese Merkmale das unbegrenzte Replikationspotential von Krebszellen. Durch die Entwicklung verschiedener Strategien ist somit auch eine entsprechende Komplexität an Ursachen der Krebsentstehung gegeben.

---

## 1.2 Das klassische Hodgkin-Lymphom

Eine Art der Krebserkrankung stellt das klassische Hodgkin-Lymphom dar. In der westlichen Welt werden jährlich 20 neue Lymphomfälle pro 100.000 Menschen diagnostiziert (Fisher *et al.*, 2004). Diese Krebsart ist von Zellen des Immunsystems abgeleitet. Mehr als 95% dieser Lymphome sind von B-Zellen abgeleitet, die restlichen 5% sind T-Zellursprungs. Laut einer Klassifizierung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind 15 verschiedene B-Zelllymphome beschrieben (Jaffe *et al.*, 1999). Diese Klassifizierung basiert nicht nur auf der Pathogenese der Lymphome, sondern vor allem auf dem Behandlungsverlauf von Patienten (Kuppers *et al.*, 2005). Für die Behandlung von Lymphomen ist die Identifizierung des ursächlichen Ereignisses von entscheidender Bedeutung. Zirka 10% der jährlich diagnostizierten Lymphome sind als klassische Hodgkin-Lymphome charakterisiert. Diese Krebsart ist durch einkernige Hodgkin-Zellen und mehrkernige Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) gekennzeichnet (Abbildung 1.2-1). Dabei repräsentieren die malignen Zellen nur ca. 1% der Gesamtzellen des Tumors. Umgeben sind die typischen Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen von einem reaktiven Infiltrat bestehend aus T-Zellen, eosinophilen Zellen, Histiozyten und Plasmazellen (Thomas *et al.*, 2004).



**Abbildung 1.2-1 Morphologie eines vom Hodgkin-Lymphom befallenen Lymphknotens**

Das klassische Hodgkin-Lymphom ist gekennzeichnet durch einkernige Hodgkin- und mehrkernige Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen). Diese malignen Zellen machen jedoch nur ca. 1% der Gesamttumormasse aus. Die eigentlichen Tumorzellen sind von einem Infiltrat aus T-Zellen, Eosinophilen und Plasmazellen umgeben. Die Abbildung zeigt eine Färbung der HRS-Zellen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (Thomas *et al.*, 2004).

Anhand von immunhistochemischen Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenmarker konnten defekte B-Zellen der Keimzentren (germline) als Ursprung für die malignen Zellen identifiziert werden. Einige Ausnahmen sind T-Zellursprungs. Aufgrund von pathologischen Aspekten wurde das klassische Hodgkin-Lymphom in vier Unterklassen unterteilt: nodulär sklerotisierend (nodular sclerosis), gemischtzellig (mixed cellularity), lymphozytenreich (lymphocyte-rich) und lymphozytenarm (lymphocyte-depleted) (Jaffe *et al.*, 1999). Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen sind zwar meist B-Zellursprungs, exprimieren aber keine typischen B-Zellmarker wie z.B. CD20 oder Proteine des B-Zellrezeptors (CD79a und CD79b) (Falini *et al.*, 1996).

---

Ebenso werden Immunglobulin (Ig) spezifische Transkriptionsfaktoren wie BOB1, OCT2 und PU.1 weder in Primärgewebe, noch in kultivierten HRS-Zellen exprimiert (Stein *et al.*, 2001). Die Analyse der umgelagerten Immunglobulingene bestätigt die klonale Herkunft der malignen Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen. Somatische Mutationen in den neu angeordneten (rearranged) Immunglobulingenen bestätigen die Herkunft der HRS-Zellen aus den Keimzentren (germinal centre) oder aus einem post-Keimzentrenstadium (Kanzler *et al.*, 1996). Gesunde B-Zellen der Keimzentren verfügen über einen funktionellen B-Zellrezeptor (BCR). Dieser fehlt den HRS-Zellen. B-Zellen mit einem Defekt im B-Zellrezeptor werden normalerweise durch Apoptose aussortiert. Auf welche Weise die HRS-Zellen dieser Selektion entgangen sind, ist nicht vollständig geklärt. Dennoch werden prä-apoptotische B-Zellen der Keimzentren als HRS-Vorläuferzellen definiert. HRS-Zellen sind durch eine starke Expression des anti-apoptotischen Proteins c-Flip, einem Inhibitor der FAS-vermittelten Apoptose, gekennzeichnet (Thomas *et al.*, 2004).

Von zentraler Bedeutung für das Entstehen des klassischen Hodgkin-Lymphoms ist die Interaktion von HRS-Zellen mit umliegenden Zellen des Körpers. Mehrere Publikationen beschreiben eine autokrine bzw. parakrine Sekretion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren in primären Tumorzellen, sowie in abgeleiteten Zellen (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2001a; Skinnider *et al.*, 2002c) (Tabelle 1.2-1).

Zytokine	Expression in Zelllinien	Expression im Primärtumor (%)
<b>Th2 Zytokine</b>		
IL-4	2/8	2
IL-13	4/5	93
IL-5	2/6	95
IL-6	5/7	75
<b>Chemokine</b>		
TARC	4/4	88
MDC	nicht getestet	87
Eotaxin	1/5	63
IP-10	nicht getestet	100
<b>TNF Familie</b>		
TNF-alpha	7/7	69
LT-alpha	5/6	77
CD40L	0/4	100
CD30L	0/3	100
RANKL	2/2	100

**Tabelle 1.2-1 Zytokinexpression in HRS-Zelllinien und Primärtumoren**

Als Zelllinien wurden L428, L1236, L540, L591, HDLM2, KMH2, Co und Ho verwendet. Die Tabelle wurde modifiziert nach Skinnider *et al.* (Skinnider *et al.*, 2002c).

Diese deregulierte Sekretion von Botenstoffen ist wahrscheinlich für die konstitutive Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Einer der bekanntesten Transkriptionsfaktoren, die konstitutiv aktiv vorliegen, ist NF $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) (Bargou *et al.*, 1997). NF $\kappa$ B reguliert die Expression einer Reihe anti-apoptotischer und proliferations-fördernder Gene in Lymphozyten. NF $\kappa$ B wird durch den Inhibitor I $\kappa$ B (inhibitor  $\kappa$ B) im Zytoplasma in inaktivem Zustand festgehalten. Nach einer Stimulation (z.B. mit TNF- $\alpha$ ) werden I $\kappa$ B-Kinasen aktiviert. Diese Kinasen induzieren eine Phosphorylierung des Inhibitors I $\kappa$ B und damit dessen proteasomalen Abbau. Dadurch wird NF $\kappa$ B freigesetzt, wandert in den Kern und aktiviert dort die Transkription seiner Zielgene. In verschiedenen HRS-Zellen, sowie Primärzellen, ist die Regulation von NF $\kappa$ B, z.B. durch Mutationen des Inhibitors oder durch Amplifikation von NF $\kappa$ B-Untereinheiten, gestört. In ca. 40% der Hodgkin-Lymphome wurde eine latente Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) festgestellt (Jarrett *et al.*, 1999). Das EBV-Virus befällt hauptsächlich B-Lymphozyten und ist in der Lage B-Zellen durch Expression von EBV-spezifischen Genen zu immortalisieren (Kuppers *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der latenten EBV-Membranproteine LMP-1 und LMP-2a eine wichtige Rolle bei der



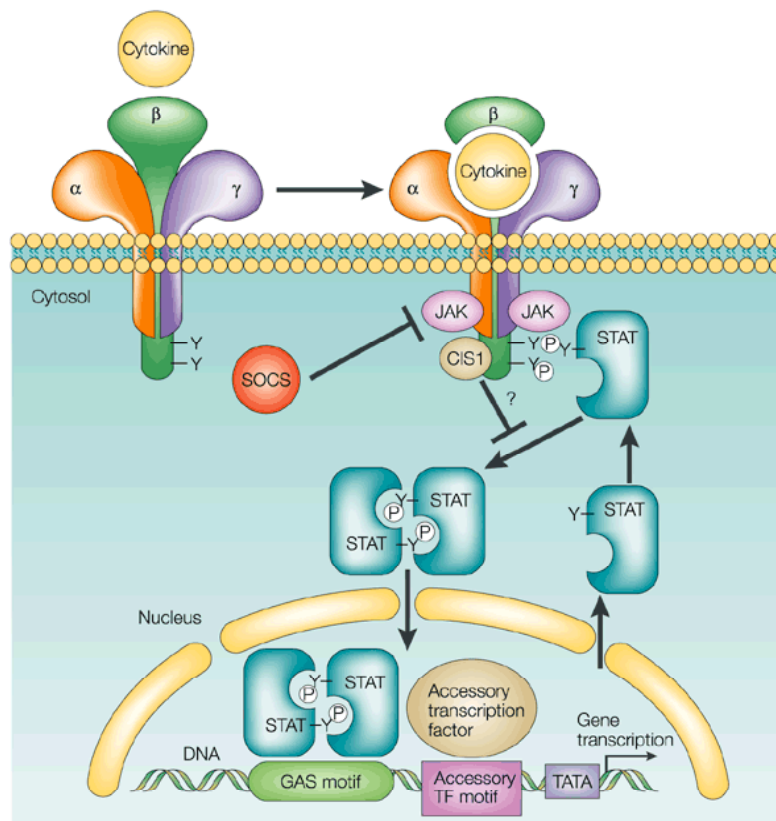
---

Entstehung des malignen Phänotyps in EBV-positiven Hodgkin-Lymphomen spielt (Kuppers, 2002). Eine latente Expression des LMP-1-Gens ist ursächlich an der konstitutiven Aktivierung von NF $\kappa$ B beteiligt (Horie *et al.*, 2002). Andere Signaltransduktionskaskaden, die in HRS-Zellen konstitutiv aktiviert vorliegen sind z.B. c-Jun und JunB (Mathas *et al.*, 2002), AKT (Morrison *et al.*, 2004), MEK/ERK (Zheng *et al.*, 2003), NOTCH1 (Jundt *et al.*, 2002) oder der JAK/STAT-Signalweg (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2001a; Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002c; Holtick *et al.*, 2005; Cochet *et al.*, 2005). Konstitutiv aktivierte Mitglieder der STAT-Familie (STAT1, 3, 5, 6) wurden in HL-Biopsien, sowie in abgeleiteten Zelllinien nachgewiesen (Skinnider *et al.*, 2001a; Kube *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2003). In den meisten Fällen wurde konstitutiv aktives STAT3 und STAT6 gefunden (Re *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang erscheint STAT3 besonders interessant, da Wang *et al.* zeigen konnten, dass STAT3 durch Regulation der Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Tumorerkennung spielt (Wang *et al.*, 2004). Eine Blockade von STAT3 ermöglichte dabei die Erkennung von malignen Zellen durch Zellen des Immunsystems. Die Funktion der JAK/STAT-Signalkaskade bei der Entstehung des klassischen Hodgkin-Lymphoms ist noch unbekannt und deshalb Gegenstand dieser Arbeit.

---

### 1.3 Die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade

Bei der JAK/STAT-Signalkaskade handelt es sich um eine Signalübertragung die transient durch Stimulation mit verschiedenen Zytokinen initiiert wird (O'Shea *et al.*, 2002). Die Aktivierung des Signalweges erfolgt durch Bindung von extrazellulären Molekülen (Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Zytokinen) an die entsprechenden Transmembranrezeptoren. Dies induziert zunächst eine Dimerisierung, sowie eine Phosphorylierung des Rezeptors und der rezeptor-assoziierten JAK-Kinasen (Janus-Kinasen). Die aktivierten JAK-Kinasen sind dann in der Lage zytoplasmatisch- lokalisierte spezifische Tyrosinreste des Rezeptors zu phosphorylieren, die als Bindestelle für die SH2-Domäne (src-homology domain 2) der STAT-Proteine (signal transducer and activator of transcription) dienen. Phosphorylierte STAT-Proteine bilden über die SH2-Domäne des einen STAT-Monomers und dem phosphorylierten Tyrosinrest des jeweils anderen Monomers Homo- oder Heterodimere. Als Dimere translozieren diese in den Zellkern, binden charakteristische DNA-Erkennungssequenzen ( $\gamma$ -activated sequence (GAS)-Elemente) und initiieren die Transkription ihrer Zielgene (Bromberg *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 2002; Kisseleva *et al.*, 2002).



Nature Reviews | Immunology

### Abbildung 1.3-2 Der JAK/STAT-Signalweg

Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges erfolgt durch Ligandenbindung (z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren) an einen spezifischen Rezeptor. Es kommt zur Dimerisierung und Phosphorylierung des Rezeptors, sowie der rezeptorgebundenen JAK (Janus)-Kinasen. Aktivierte JAK-Kinasen phosphorylieren konservierte Tyrosinreste des Rezeptors und generieren damit Bindestellen für die SH2 (src homology domain 2)-Domäne der STAT-Proteine (signal transducer and activator of transcription). Phosphorylierte STAT-Moleküle homo- oder heterodimerisieren, translozieren in den Zellkern und initiieren dort durch Bindung an bestimmte GAS ( $\gamma$ -activated sequence)-Elemente in den Promotorregionen ihrer Zielgene deren Transkription. (Slideshow: Nature Reviews Immunology 1; 200-208 (2001))

---

## 1.4 Die STAT-Familie

Die Familie der STAT-Proteine umfasst 7 Mitglieder: STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B und 6. Alle Mitglieder dieser Familie weisen eine vergleichbare Struktur und einen ähnlichen Mechanismus der Signalübertragung auf. Die Struktur der STAT-Proteine ist exemplarisch in Abbildung 1.4-3 dargestellt.



### Abbildung 1.4-3 Schematische Darstellung der STAT-Proteine

Die Abbildung zeigt exemplarisch den strukturellen Aufbau der STAT-Proteine. STAT-Proteine bestehen aus fünf funktionell unterschiedlichen Domänen. Gekennzeichnet sind die N-terminale-Domäne (ND), die Coiled-coil Domäne, die DNA-Bindedomäne (DBD), die SH2-Domäne, der konservierte Tyrosinrest (Y), sowie die Transaktivierungsdomäne (TAD).

Die STAT-Proteine bestehen aus fünf strukturell und funktionell unterschiedlichen Domänen. Die N-terminale-Domäne (ND) ist hoch konserviert und vermittelt die Dimer-Dimer Interaktion. Des Weiteren spielt diese Domäne eine wichtige Rolle bei der Translokation in den Zellkern (Kisseleva *et al.*, 2002). Die Coiled-coil Domäne ist wichtig für Protein-Proteininteraktionen, (Schindler, 2002). Die DNA-Bindedomäne (DBD) ist essentiell für die Bindung der STAT-Moleküle an spezifische DNA-Elemente in den Promotorregionen der Zielgene. Der DBD folgt eine Linker-Domäne, die nicht nur die Verbindung zur SH2 (src homology domain 2)-Domäne herstellt, sondern auch für die Tertiärstruktur des Moleküls essentiell ist (Schindler, 2002). Die SH2-Domäne vermittelt die Bindung der STAT-Proteine miteinander (Dimerbildung), aber auch die Bindung der STATs an den Rezeptor.

---

Der C-terminale Bereich des Moleküls beherbergt die Transaktivierungsdomäne (TAD), welche letztendlich für die Transkription der Zielgene verantwortlich ist. Ausserdem ist die Transaktivierungsdomäne sehr wichtig für die Rekrutierung von Koaktivatoren (Litterst *et al.* 2001). Alle STAT-Proteine werden durch Tyrosin-Phosphorylierung im C-terminalen Bereich aktiviert. Bei den STAT-Proteinen handelt es sich um latente Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation unterschiedlicher biologischer und physiologischer Prozesse beteiligt sind (z.B. Embryonalentwicklung, Immunität) (O'Shea *et al.*, 2002). STAT3 und STAT5 kommen in den meisten Zelltypen vor und werden durch eine Vielzahl verschiedener Moleküle aktiviert (für STAT3: IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, Leptin, EGF; für STAT5: IL-2, IL-3, GM-CSF, Prolaktin, Erythropoetin, Thrombopoetin, Wachstumshormone). STAT1 und STAT2 spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung der Interferon-Antwort und werden spezifischer aktiviert (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , IL-12) (Bromberg *et al.*, 1996). STAT4 und STAT6 regulieren als Antagonisten die Differenzierung von naiven Th-Zellen zu Th1- und Th2-Zellen. STAT4 wird spezifisch durch IL-12 aktiviert und reguliert die Polarisierung in Richtung Th1-Zellen. STAT6 wird durch IL-4 und IL-13 aktiviert und begünstigt die Th2-Polarisierung (Kaplan *et al.*, 1996). STAT-Proteine werden aber nicht nur durch Rezeptor-vermittelte Stimuli aktiviert, sondern auch durch intrazelluläre Kinasen (z.B. SRC), sowie Translokationsprodukte mit Kinaseaktivität (z.B. BCR-ABL, NPM-ALK, TEL-JAK2) (Huang *et al.*, 2002; Chiarle *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2001). Diese Art der Aktivierung ist hauptsächlich für STAT3 und STAT5 bekannt und resultiert in einer konstitutiven Signalübertragung, was ursächlich für die Tumorentstehung mitverantwortlich ist. Die transiente Aktivierung und damit die strikte Regulation der STAT-Proteine ist essentiell für den geregelten Ablauf einer Reihe fundamentaler Prozesse.

Unkontrollierte STAT-Aktivierung ist ursächlich mit der Entstehung verschiedener maligner Phänotypen verbunden. In Tabelle 1.4-2 ist eine Zusammenfassung der verschiedenen konstitutiv aktivierten STAT-Proteine in humanen malignen Erkrankungen dargestellt.

Im Folgenden wird auf die für diese Arbeit relevanten STAT-Proteine näher eingegangen.

<b>Tumorart</b>	<b>Aktivierte STATs</b>
Multiple Myelome	STAT1, STAT3
<b>Leukämien:</b>	
HTLV1-abhängig	STAT3, STAT5
Erythroleukämie	STAT1, STAT5
Akute myeloische Leukämie (AML)	STAT1, STAT3, STAT5
Chronische myeloische Leukämie (CML)	STAT5
<b>Lymphome:</b>	
Burkitt Lymphom	STAT3
Mycosis fungoides	STAT3
T-Zelllymphom	STAT3
Non-Hodgkin Lymphom	STAT3
Anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL)	STAT3
<b>Solide Tumore:</b>	
Brustkrebs	STAT1, STAT3, STAT5
Tumore des Kopf- und Nacken-Bereichs	STAT1, STAT3, STAT5
Melanome	STAT3
Eierstockkrebs	STAT3
Lungenkrebs	STAT3
Pankreaskrebs	STAT3
Prostatakrebs	STAT3

**Tabelle 1.4-2 STAT-Aktivierung bei Krebserkrankungen**

Die Tabelle basiert auf den Referenzen (Bowman *et al.*, 2000) und (Buettner *et al.*, 2002).

## 1.5 STAT1

STAT1 und STAT3 werden zum Teil durch die gleichen Zytokine aktiviert (z.B. IL-6, IL-10, LIF), haben aber eine eher gegensätzliche Funktion. STAT1 ist hauptsächlich ein Vermittler von Typ I- ( $\alpha$  und  $\beta$ ) und Typ II- ( $\gamma$ ) Interferon-stimulierten Signalen (Bromberg *et al.*, 1996). Typ I-Interferon aktiviert zusätzlich zu STAT1 auch STAT2, so dass sich bei dieser Art des Stimulus Heterodimere bilden können. Diese bilden zusammen mit einem 48kDa Protein (IRF9, p48) einen Komplex (ISGF3), der spezifisch ISRE (IFN-stimulated response elements)-Elemente binden kann und dadurch die Transkription antiviraler Gene initiiert. Typ II-Interferon aktiviert ausschließlich STAT1.

---

STAT1-Homodimere binden GAS ( $\gamma$ -activated sequence)-Elemente auf der DNA. Mit Hilfe von STAT1 „Knockout“-Mäusen (STAT1<sup>-/-</sup>) wurde bestätigt, dass STAT1 eine wichtige Rolle bei der Interferon-vermittelten Immunabwehr spielt (Durbin *et al.*, 1996; Meraz *et al.*, 1996). STAT1<sup>-/-</sup> Mäuse sind anfällig für Infektionen und virale Pathogene. Da die myeloide und lymphoide Entwicklung in diesen Mäusen unauffällig ist, geht man davon aus, dass STAT1 vor allem eine Funktion bei der Induktion der Immunabwehr und weniger bei der Hämatopoese hat (Coffer *et al.*, 2000).

Die Rolle von STAT1 bei der Entstehung von Tumoren wird kontrovers diskutiert. Eine pro-apoptotische Funktion von STAT1 wird gestützt durch den Verlust von STAT1 in Magenkrebs (gastric adenocarcinoma) (Abril *et al.*, 1998), in T-Zelllymphomen (Sun *et al.*, 1998) und Melanomen (Wong *et al.*, 1997; Pansky *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu ist eine konstitutive Aktivierung von STAT1 beschrieben für Brustkrebs, einige Leukämien (Bowman *et al.*, 2000; Buettner *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2004), sowie für das klassische Hodgkin-Lymphom (Garcia *et al.*, 2003). Diese unterschiedlichen Beobachtungen deuten darauf hin, dass die pro- bzw. anti-apoptotische Funktion von STAT1 Zelltyp-spezifisch sein könnte. Die genaue Funktion von STAT1 im klassischen Hodgkin-Lymphom ist noch unklar.

## **1.6 STAT3**

STAT3 wird durch viele Zytokine und Botenstoffe aktiviert (siehe Kapitel 1.3) und ist in fast allen Zelltypen zu finden. Im Gegensatz zu STAT1 ist ein „Knockout“ von STAT3 (STAT3<sup>-/-</sup>) in Mäusen embryonal lethal (Takeda *et al.*, 1997). Diese Beobachtung deutet bereits an, dass STAT3 eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielt. Es konnte gezeigt werden, dass STAT3 essentiell für die Selbsterneuerungskapazität (self-renewal capacity) embryonaler Stammzellen ist (Matsuda *et al.*, 1999). Andererseits ist STAT3 ein wichtiger Regulator für den Rückgang des alveolaren Brustdrüsengewebes nach der Stillzeit (involution) (Hennighausen *et al.*, 1997). Dies deutet darauf hin, dass die Funktion von STAT3 als Apoptose- oder Proliferations-Induktor abhängig ist von der Expression Zelltyp-spezifischer Zielgene. Darüber hinaus

---

spielt STAT3 als anti-apoptotischer Signalvermittler eine ursächliche Rolle bei der Entstehung von malignen Erkrankungen. Konstitutive Aktivierung von STAT3 ist nicht nur beschrieben für solide Tumore wie Brustkrebs, Eierstockkrebs (Burke *et al.*, 2001), Tumore des Kopf-und Nacken-Bereichs (head and neck cancer) (Sriuranpong *et al.*, 2003), sondern auch für multiple Myelome (Catlett-Falcone *et al.*, 1999) und das klassische Hodgkin-Lymphom (Kube *et al.*, 2001; Holtick *et al.*, 2005; Cochet *et al.*, 2005). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Inhibition von STAT3 mit pharmakologischen Inhibitoren, dominant-negativen Konstrukten oder Antisense/siRNA-Molekülen sowohl *in vitro* (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Burke *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2001; Kube *et al.*, 2001; Alas *et al.*, 2003; Bharti *et al.*, 2003; Amin *et al.*, 2004; Nagel-Wolfrum *et al.*, 2004; Holtick *et al.*, 2005; Cochet *et al.*, 2005), als auch im Mausmodell (Niu *et al.*, 1999; Blaskovich *et al.*, 2003) das Tumorwachstum stoppt.

## 1.7 STAT5

STAT5 kommt in Form zweier sehr homologer Gene, STAT5A und STAT5B, in der Zelle vor. Ähnlich wie STAT3 ist STAT5 in fast allen Zelltypen zu finden. Beide STAT5-Gene werden durch Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und Hormonen (z.B. IL-2, IL-3, GM-CSF, Prolaktin, Erythropoetin, Thrombopoetin) induziert. Obwohl die Struktur von STAT5A und STAT5B sehr ähnlich ist, gibt es doch Unterschiede in ihrer Funktion. Bei STAT5A „Knockout“-Mäusen treten Störungen bei der Brustdrüsenentwicklung, sowie der Bildung von Milchproteinen auf (Liu *et al.*, 1997). Bei STAT5B-/- Mäusen ist die Übertragung von Wachstumshormon-abhängigen Signalen unterbrochen (Udy *et al.*, 1997; Sternberg *et al.*, 2004).

Aus der Literatur ist bekannt, dass STAT5B die Expression von geschlechtsspezifischen Genen in der Leber reguliert (Teglund *et al.*, 1998). STAT5A scheint in diesem Zusammenhang eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Die Gründe dafür sind nicht vollständig bekannt, hängen aber wahrscheinlich mit strukturellen Unterschieden in der DNA-Bindedomäne zusammen. Ebenso könnten Unterschiede bei der allgemeinen Expression



---

abhängig vom Zelltyp eine Rolle spielen (Grimley *et al.*, 1999). Neben unterschiedlichen Funktionen von STAT5A und STAT5B gibt es allerdings auch eine gemeinsame Genregulation. Am besten untersucht ist dabei die Funktion von STAT5 bei der terminalen Differenzierung der Brustdrüse während der Schwangerschaft und Stillzeit. In diesem Zusammenhang regulieren sowohl STAT5A, als auch STAT5B, die Bildung verschiedener Milchproteine ( $\beta$ -Kasein, WAP (whey acidic acid protein)) (Liu *et al.*, 1995). Des Weiteren spielen beide STAT5-Gene eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen und hämatopoetischen Zellen. In diesem Zellsystem vermittelt STAT5 hauptsächlich einen proliferations-fördernden Effekt von Zytokinen (z.B. IL-2, IL-3) (Kieslinger *et al.*, 2000). Ein Doppel-„Knockout“ von STAT5A und STAT5B resultiert in Störungen der hämatopoetischen Entwicklung (Teglund *et al.*, 1998; Sternberg *et al.*, 2004). Konstitutiv aktives STAT5 ist, ähnlich wie STAT3, in verschiedenen Tumorarten zu finden. Dazu gehören neben soliden Tumoren auch verschiedene Leukämien (siehe Tabelle 1.4-2). Auch in HL-Biopsien und abgeleiteten Zelllinien des klassischen Hodgkin-Lymphoms wurde konstitutiv aktives STAT5 nachgewiesen (Skinnider *et al.*, 2002c). Des Weiteren konnte STAT5A als direktes Zielgen von NF $\kappa$ B in einigen HL-Zelllinien nachgewiesen werden (Hinz *et al.*, 2002). Über die Funktion und die genaue Regulation von STAT5 bei diesem Krankheitsbild ist allerdings noch nichts bekannt.

## **1.8 STAT6**

STAT6 wird vor allem durch IL-4 und IL-13 aktiviert und spielt eine wichtige Rolle bei der humoralen Immunabwehr. IL-4 und IL-13 begünstigen über STAT6 als Signalvermittler die Polarisierung naiver Th-Zellen zu Th2-Zellen. Th2-Zellen sind maßgeblich an der Eliminierung von extrazellulären Pathogenen beteiligt. Untersuchungen an STAT6 „Knockout“-Mäusen (STAT6<sup>-/-</sup>) bestätigen diese Beobachtungen (Kaplan *et al.*, 1996; Shimoda *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1996). STAT6<sup>-/-</sup> Mäuse sind nach Infektion mit extrazellulären Pathogenen nicht mehr in der Lage eine Th2-Antwort zu entwickeln. Ohne STAT6 können B-Zellen nicht mehr die IL-4-vermittelte

---

Expression von CD23 und MHC-Klasse II-Molekülen gewährleisten. Des Weiteren treten Defekte beim Klassenwechsel zum IgE-Isotyp (class switching) der Immunoglobuline (Ig) auf (Kaplan *et al.*, 1996; Shimoda *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1996). IgE ist verantwortlich für die Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen nach Antigenkontakt. Voraussetzung für einen erfolgreichen Klassenwechsel zum IgE-Isotyp sind verschiedene Rekombinationsereignisse in den konstanten Bereichen der schweren Kette der Immunoglobulingene. Die Transkription des GL (Keimbahn)  $\epsilon$ -Transkripts im C $\epsilon$ -Locus ist dafür unerlässlich. Die Aktivierung dieses Promotorbereichs wird durch NF $\kappa$ B und STAT6 gesteuert (Linehan *et al.*, 1998).

Die Rolle von STAT6 bei asthmatischen Erkrankungen, z.B. Airway-Hyperresponsivness (AHR) ist gut charakterisiert und lässt sich auf eine Polarisation der Th2-Antwort zurückführen (Brombacher, 2000). Die Rolle von STAT6 in der Onkogenese ist weniger gut charakterisiert. Konstitutive Aktivierung von STAT6 ist für das klassische Hodgkin-Lymphom beschrieben und assoziiert mit autokriner Sekretion von IL-13 (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2001a; Skinnider *et al.*, 2002b). Eine Inhibition der IL-13-vermittelten Signalkaskade mit einem neutralisierenden IL-13-Antikörper löst in einigen HL-Zelllinien Apoptose aus (Trieu *et al.*, 2004). Inwieweit dies durch STAT6 reguliert ist, ist nicht untersucht. Unabhängig von IL-13- oder IL-4-Sekretion wurde konstitutive Aktivierung von STAT6 in primären mediastinal großzelligen B-Zelllymphomen (mediastinal large B cell lymphoma (PMBL)) detektiert (Guiter *et al.*, 2004). Studien an STAT6<sup>-/-</sup> Mäusen belegen eine stärkere Tumorabwehr gegen primäre und metastasierende Tumore. Dies ist höchstwahrscheinlich auf eine größere Menge an zytotoxischen T-Zellen zurückzuführen ist, die in STAT6<sup>-/-</sup> Mäusen nachgewiesen wurde (Kacha *et al.*, 2000; Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2000).

---

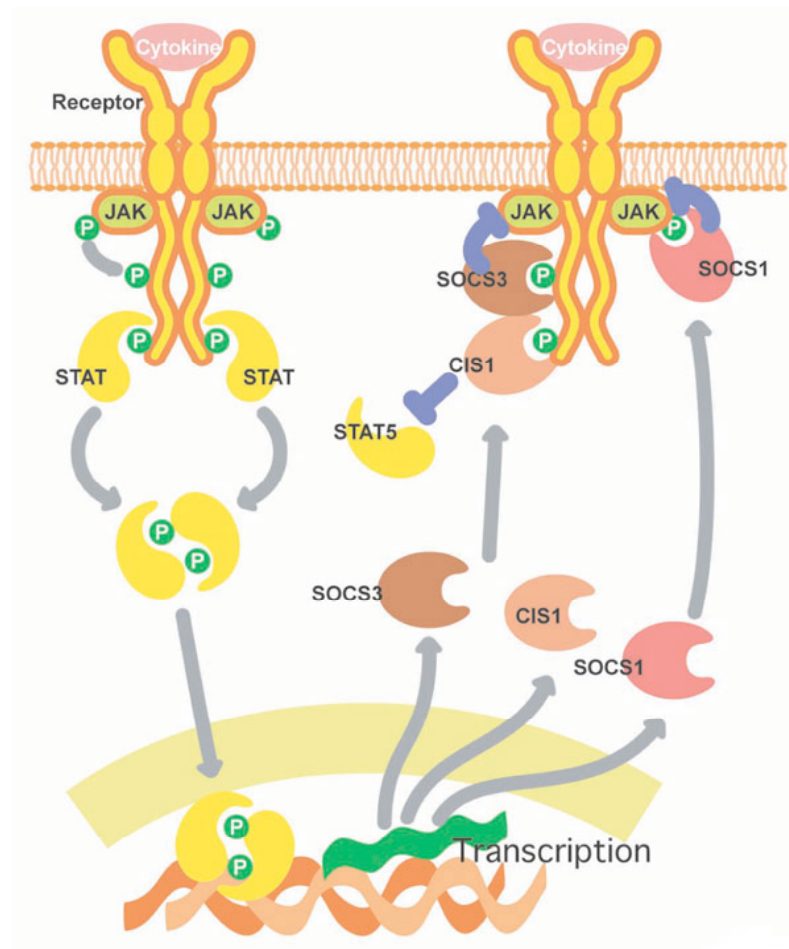
## 1.9 Negativregulatoren der JAK/STAT-Signalkaskade

Um eine transiente Aktivierung der STAT-Proteine und damit eine regulierte Signalübermittlung zu gewährleisten, stehen verschiedene Negativregulatoren zur Verfügung. Veränderungen in der Negativregulation oder den Regulatoren selbst (Mutationen oder veränderte Expression) können häufig zur konstitutiven Aktivierung der STAT-Proteine beitragen. Zu den Negativregulatoren gehören Tyrosinphosphatasen, wie z.B. SHP1 und SHP2 (SH2 containing phosphatase) (Starr *et al.*, 1999). Diese Phosphatasen sind enzymatische Gegenspieler der Tyrosinkinasen. Sie sind in der Lage den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, die JAK-Kinasen oder STAT-Proteine selbst zu binden und damit die Signalübertragung zu unterbinden (Neel *et al.*, 1997).

Eine weitere Möglichkeit der negativen Regulation des Signalweges sind die PIAS-Proteine (protein inhibitor of activated STAT) (Shuai *et al.*, 2003), die allerdings nicht alle STATs inhibieren. PIAS-Proteine blockieren den Signalweg durch Bindung aktivierter STAT-Dimere. Dadurch geht die DNA-Bindefähigkeit der STAT-Moleküle verloren und die Transkription der Zielgene ist nicht länger möglich. Des Weiteren ist bekannt dass PIAS-Proteine eine wichtige Rolle bei der Sumoylierung von Proteinen spielen (E3-Ligaseaktivität) und damit die Funktion und den Abbau von Proteinen steuern können (Jackson, 2001).

Eine weitere Familie an Negativregulatoren sind die SOCS-Proteine (suppressor of cytokine signaling) (Starr *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1999), die auch als JAB (JAK binding) (Endo *et al.*, 1997) oder SSI (STAT induced STAT inhibitor) (Naka *et al.*, 1997) bezeichnet werden. SOCS-Proteine sind direkte Zielgene der STAT-Proteine und regulieren deren Aktivierung in einer Art negativer Rückkopplung (negative feedback).





#### Abbildung 1.9-5 SOCS-Proteine regulieren den JAK/STAT-Signalweg

SOCS-Proteine sind direkte Zielgene der JAK/STAT-Signalkaskade und regulieren deren Aktivität in einer Art negativer Rückkopplung (negative feedback). Dabei unterscheiden sie sich in ihrer Wirkungsweise. (Kubo *et al.*, 2003).

Die Expression der SOCS-Proteine unterliegt normalerweise einer strikten Regulation und spielt eine essentielle Rolle für die Inaktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade. Verschiedene Publikationen deuten auf eine Beteiligung der SOCS-Proteine bei der Tumorentstehung hin. In verschiedenen Tumorarten, wie z.B. im Leberkarzinom und in multiplen Myelomen, ist die Expression des SOCS1-Gens durch Methylierung von SOCS1 nicht möglich (Yoshikawa *et al.*, 2001; Galm *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003). Ebenso wird die SOCS3-Expression durch eine Methylierung der Promotorregion bei Lungenkrebs unterdrückt (He *et al.*, 2003). Mutationen im SOCS1-Transkript wurden in Lymphomzelllinien

---

(mediastinal lymphoma), sowie in primären B-Zelllymphomen nachgewiesen (Melzner *et al.*, 2005). Rekonstituiert man die Expression von SOCS1 mittels transienter Transfektion wird das Tumorwachstum inhibiert und die Zellen gehen in Apoptose (Yoshikawa *et al.*, 2001).

Die Expression der SOCS-Proteine im klassischen Hodgkin-Lymphom ist noch nicht untersucht. Ebenso ist nicht bekannt, ob diese Proteine eine Bedeutung für die Pathogenese des malignen Phänotyps haben. Dies soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

## **1.10 Inhibition der JAK/STAT-Signalkaskade als Ansatzpunkt für Krebstherapien**

### **1.10.1 Nicht-sequenz-spezifische Inhibition**

Obwohl bei der Behandlung verschiedenster Krebsarten mittels Chemo- und Strahlentherapie große Fortschritte gemacht wurden und immer präzisere Verfahren entwickelt wurden, treten nach wie vor schwerwiegende Nebenwirkungen und Sekundärerkrankungen auf. Dies weist auf die Notwendigkeit neuer Therapieansätze hin. Grundvoraussetzung für gezielte Therapien mit möglichst geringen Nebenwirkungen ist die Kenntnis des ursächlichen molekularen Ereignisses der Erkrankung. In diesem Zusammenhang steht die Entwicklung von Inhibitoren, die gezielt Signalwege oder einzelne Kinasen blockieren. Für die JAK/STAT-Signalkaskade sind aus der Literatur verschiedene Substanzen bekannt, die entweder auf Ebene der Kinasen oder einzelne STAT-Proteine angreifen. Am besten untersucht sind Substanzen, die gezielt JAK2/STAT3- vermittelte Signale blockieren. Dazu gehören Tyrphostine (AG490, AG17, AG25), die bereits in verschiedenen Tumorsystemen *in vitro*, aber auch *in vivo* getestet wurden (Alas *et al.*, 2003; Barton *et al.*, 2004; Burke *et al.*, 2001; Holtick *et al.*, 2005; Catlett-Falcone *et al.*, 1999). Substanztests im Hochdurchsatz-Verfahren identifizieren auch immer mehr natürlich vorkommende Substanzen wie Piceatannol, Cucurmin, Cucurbitacin I und Q, Indirubin oder Arsen-Verbindungen als wirksame Inhibitoren von STAT-Proteinen (Alas *et al.*, 2003; Bharti *et al.*, 2003; Dorai *et*

---

*al.*, 2004; Uddin *et al.*, 2005; Blaskovich *et al.*, 2003; Nam *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2004). Auch natürlich vorkommende Liganden des Fettmetabolismus, wie 15d-PGJ(2) (15-Deoxy-delta-12,14-Prostaglandin J2) erweisen sich als anti-inflammatorisch wirksam durch Inhibition der JAK/STAT-Signalkaskade in primären Lymphozyten, sowie in einem Zellmodell für rheumatoide Arthritis (Ji *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Zusätzlich dazu konnte gezeigt werden, dass Platin-Verbindungen hauptsächlich durch Inhibition von STAT3 in einem Darmkrebsmodell *in vivo*, sowie bei Brust- und Prostatakrebs *in vitro* viel versprechende anti-Tumoraktivität besitzen (Turkson *et al.*, 2004; Turkson *et al.*, 2005).

### **1.10.2 Sequenz-spezifische Inhibition**

Ein anderer Ansatz zur Blockade der JAK/STAT-Signalkaskade basiert auf den Negativregulatoren des Signalweges selbst (PIAS, SOCS). Je nach verwendetem Inhibitor kann dieser Ansatz auf Ebene der Kinasen angreifen und damit die komplette nachgeschaltete Signalübertragung der Kinase blockieren (SOCS1, SOCS3) oder einzelne Proteine (z.B. STAT1, STAT3) können selektiv inhibiert werden (PIAS1, PIAS3, GRIM-19) (Starr *et al.*, 1999; Alexander *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Um eine möglichst spezifische Inhibition von Proteinen zu erreichen wurden immer mehr sequenz-spezifische Ansätze entwickelt. Dabei kommen synthetische Peptide zum Einsatz, die spezifisch die Region um die konservierte Tyrosinphosphorylierung repräsentieren und somit eine Dimersisierung sowie eine DNA-Bindung verhindern (Jing *et al.*, 2005). Solch ein Peptid (PYLKTK) wurde bereits erfolgreich zur Inhibition von STAT3 (Y705) *in vitro* eingesetzt. Andere sequenzspezifische Ansätze basieren direkt auf der DNA-Sequenz des Zielgens (Antisense-Oligonukleotide, siRNAs). Unmodifizierte Antisense-Oligonukleotide sind aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit nur begrenzt einsetzbar. Mittlerweile lassen sich solche Antisense-Konstrukte durch chemische Modifikationen stabilisieren (z.B. Phosphorothioate, Morpholinos). Ein solches STAT3-spezifisches Antisense-Molekül wurde bereits erfolgreich in Xenograftmodellen (multiple Myelome) getestet und befindet sich zur Zeit in

---

vorklinischen Studien (ISIS345794 der Firma ISIS) (Gleave *et al.*, 2005; Chiarle *et al.*, 2005). Des Weiteren wurden verschiedene siRNAs (small interfering RNA) gegen STAT3 entwickelt, die bereits erfolgreich in verschiedenen Zellmodellen *in vitro* eingesetzt wurden (Ling *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Konnikova *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang kommen unterschiedliche Systeme zur Bereitstellung der siRNAs in der Zelle zum Einsatz. Diese beinhalten eine transiente Bereitstellung von kurzen synthetischen siRNAs, sowie eine Verpackung der relevanten siRNA in Liposome oder ähnliche Materialien, aber auch eine dauerhafte Expression der siRNA mittels retro- bzw. lentiviraler Vektoren. Für eine Therapie kommen allerdings nur solche Systeme in Frage, die einen größtmöglichen Nutzen für einen Patienten über einen möglichst langen Zeitraum gewährleisten.

Andere sequenz-spezifische Ansätze basieren auf der Entwicklung von so genannten G-Quartet-Oligonukleotiden (GQ-ODN). Dabei handelt es sich um Moleküle, die spezifisch bestimmte Stellen innerhalb der SH2-Domäne von STAT-Dimeren besetzen und damit die Dimere destabilisieren (Jing *et al.*, 2005). Dabei schützt die G-Quartet-Struktur des Oligonukleotids das Molekül vor einem Abbau durch Endonukleasen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass solche STAT3-spezifischen Strukturen das Tumorwachstum von Brust- und Prostata Tumoren in Xenograftmodellen erheblich verringern (Jing *et al.*, 2005). Neben Kinasen oder Proteinen selbst, lassen sich aber auch die Bindestellen von Proteinen in den Promotorregionen ihrer Zielgene spezifisch blockieren. Auf einem solchen Ansatz basiert die Entwicklung von „Decoy“-Oligonukleotiden. Dabei handelt es sich um kurze doppelsträngige Oligonukleotide (ca. 15 Basenpaare), die eine bestimmte Promotorsequenz beinhalten, und von dem aktivierten Protein erkannt werden, dass dann nicht mehr an die Promotorregion seiner Zielgene binden kann. Erste erfolgreiche Ergebnisse wurden bereits mit einem STAT3-spezifischen „Decoy“-Oligonukleotid *in vivo* erzielt (Jing *et al.*, 2005).



---

Des Weiteren kommen so genannte neutralisierende Antikörper zum Einsatz, die spezifisch gegen bestimmte extrazelluläre Domänen von Proteinen oder Rezeptoren gerichtet sind (Re *et al.*, 2005).

### **1.10.3 Therapeutische Ansätze zur Behandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms**

Obgleich eine Behandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms mit konventioneller Chemo- bzw. Strahlentherapie zunächst sehr vielversprechend war, manifestierten sich schwere Sekundärerkrankungen, die unter anderem auf hoch dosierte Chemotherapeutika zurückzuführen sind. Solche Folgeerkrankungen beinhalten sowohl sekundäre Krebserkrankungen, wie Lungen- oder Brustkrebs, aber auch kardiovaskuläre Erkrankungen (Re *et al.*, 2005). Aus diesem Grund besteht vor allem für die Behandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms die Notwendigkeit alternativer Strategien. Dazu gehört zu allererst die Identifizierung eines therapeutischen Ansatzpunktes auf molekularer Ebene. In diesem Zusammenhang wurden bereits verschiedene neutralisierende Antikörper gegen Rezeptoren und Proteine entwickelt, die mit dem anti-apoptotischen und proliferations-fördernden Phänotyp von HL korrelieren. Dazu gehören: anti-CD30-Antikörper (SGN-30, MDX-60), anti-CD20-Antikörper (Rituximab), anti-IL-13-Antikörper (CAT-354), anti-RANKL-Antikörper (AMG162), sowie anti-TRAIL-R1-Antikörper. Aber auch Substanzen, die die NF $\kappa$ B-Signalkaskade inhibieren (Arsentrioxid, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) erweisen sich im HL-Zellmodell als vielversprechend. Einen anderen Ansatz liefern Inhibitoren des 26S-Proteasoms, über das z.B. der NF $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B abgebaut wird. Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (PS-341, Millenium Pharmaceuticals) wurde bereits von der FDA (Food and Drug Administration, USA) zur Behandlung multipler Myelome zugelassen (Re *et al.*, 2005). Dieser Inhibitor wurde *in vitro* auch an HRS-Zellen getestet und bewies auch in diesem Zellsystem großes Potential (Re *et al.*, 2005). Ein anderer Proteasom-Inhibitor (MG132), der unter anderem durch Inhibition des JAK/STAT-Signalweges wirkt, ist ebenfalls sehr effizient in HL-Zelllinien und befindet sich zur Zeit in präklinischen Studien (Izban *et al.*, 2001; Re *et al.*, 2005). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass

---

einzelne oder mehrere Mitglieder der JAK/STAT-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der Entstehung des malignen Phänotyps dieser Erkrankung spielen könnten. Dennoch ist nicht vollständig bekannt welche Proteine daran beteiligt sind und wie sie reguliert werden. Diese Fragestellung ist allerdings von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung zukünftiger Strategien zur Behandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms. Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Bedeutung einzelner STAT-Mitglieder für die Pathogenese dieser Erkrankung zu untersuchen und damit neue Zielgene für therapeutische Ansätze zu liefern.

### **1.11 Zielsetzung**

Biopsien und abgeleitete Zelllinien des klassischen Hodgkin-Lymphoms (HL) sind gekennzeichnet durch autokrine bzw. parakrine Sekretion von Zytokinen (z.B. IL-6, IL-13). Diese deregulierte Ausschüttung von Botenstoffen resultiert in der konstitutiven Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden. Dazu gehört auch der JAK/STAT-Signalweg. Die Bedeutung dieses Signalweges, sowie die Funktion einzelner Komponenten der JAK/STAT-Signalkaskade für die Pathogenese der malignen Erkrankung sind weitgehend unbekannt und Gegenstand dieser Arbeit. Dabei sollen im Einzelnen gezielt folgende Fragestellungen behandelt werden:

- 1.) Mit Hilfe von Gelretardierungsexperimenten und Immunfärbungen soll untersucht werden, welche Mitglieder des JAK/STAT-Signalweges konstitutiv aktiviert vorliegen. Dazu werden fünf verschiedene HL-Zelllinien verwendet, die repräsentativ für das Hodgkin-Lymphom (HL) sind.
- 2.) Um die Bedeutung des Signalweges für zelluläre Prozesse wie Proliferation und Überleben, sowie den Aktivierungsmechanismus der STAT-Proteine zu analysieren, werden synthetische Kinase-Inhibitoren (AG490, Cucurbitacin I) verwendet. In diesem Zusammenhang soll außerdem die Spezifität der verwendeten Inhibitoren getestet werden.

- 
- 3.) Um gezielt die Funktion von STAT3 und STAT6 im klassischen Hodgkin-Lymphom zu untersuchen, kommen sequenz-spezifische Moleküle (siRNAs) in einem lentiviralen Expressionssystem zum Einsatz.
  - 4.) Nachdem sich gezeigt hatte, dass STAT6 wichtig für das Überleben von HL-Zellen ist, soll der Mechanismus der STAT6-vermittelten anti-apoptotischen Wirkung mit Hilfe eines Microarrays untersucht werden. Dabei sollen neue Zielgene von STAT6 identifiziert werden, die anti-apoptotisch wirken.
  - 5.) Für einige Tumorzellsysteme, sowie Primärtumore, ist eine Störung der negativen Regulation der JAK/STAT-Signalkaskade durch die SOCS-Proteine beschrieben. Diese werden häufig gar nicht oder fehlerhaft exprimiert und tragen damit zu der Entstehung des malignen Phänotyps bei. In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob SOCS1 und SOCS3 in HL-Biopsien und abgeleiteten Zellen exprimiert werden und ob deren Expression die Aktivierung von STAT3 und STAT6 reguliert.
  - 6.) Da in einigen HL-Biopsien und abgeleiteten HL-Zelllinien keine Expression von SOCS1 und SOCS3 nachgewiesen werden konnte, soll die Bedeutung dieser Negativregulatoren durch Überexpression in HL-Zelllinien untersucht werden. Dabei wird in Gelretardierungsexperimenten untersucht, ob SOCS1 und SOCS3 die Aktivierung von STAT3 und STAT6 inhibieren, welche Auswirkungen sich auf zelluläre Prozesse ergeben und inwieweit andere Signalvermittler im Hodgkin-Lymphom beeinflussen werden.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Chromatographiepapier No. 3649	Schleicher & Schuell, Dassel
MicroSpin™ G-25 Säulen	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
PVDF-Membran "porablot", 0,2 µm	Millipore, Eschborn
Röntgenfilme, Kodak Super RX	Kodak, Stuttgart
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschalen (8,7 cm <sup>2</sup> )	Greiner, Frickenhausen
6, 12, 24, 96 – Loch-Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen

#### 2.1.2 Chemikalien

Acrylamid, 4K, 29:1, 30% (w/v)	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Peglab, Erlangen
AG490, 50-100 µM	Tocris, Bristol (UK)
ε-Aminocapronsäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydroxid	Fluka, Buchs (Schweiz)
APS	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
BSA	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Cucurbitacin I, 10 µM	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fluka, Buchs, (Schweiz)
dNTP Mix, 10 mM	Peglab, Erlangen
DTT	AppliChem, Darmstadt
ECL plus Chemilumineszenzsystem	Amersham Pharmacia, Braunschweig
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Enzyme zur Restriktion	New England Biolabs (NEB), Schwalbach

Ethanol	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd, 37% (w/w)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Klenow-Enzym	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Natrium-ortho-vanadat	Sigma, Deisenhofen
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Pepstatin	Fuka, Buchs (Schweiz)
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Poly (dl:dC)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Propidiumjodid	Sigma, Deisenhofen
Radiochemikalien	Amersham Pharmacia, Braunschweig
RNase, DNase frei	Sigma, Deisenhofen
Rnasin	Invitrogen, Eggenstein
SDS	Merck, Darmstadt
SYBR green II	MoBiTec, Göttingen
Taq-Polymerase	Invitrogen, Eggenstein
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Trifast	Peqlab, Erlangen
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
Thermo-Pol-Puffer	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
Vent-Polymerase	New England Biolabs (NEB), Schwalbach

### 2.1.3 Lösungen

Alle Grundchemikalien wurden in reinster Qualität verwendet. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Lösungen und Puffer wurden autoklaviert (20 min. bei 121°C und 2 bar) oder steril filtriert.

10×TBE	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0
10× TAE	400 mM Tris/Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0

DEPC Wasser	0,2 % (v/v) DEPC
TBST	10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20
SDS-Laufpuffer	250 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS pH 8,0
Anodenpuffer 1	300 mM Tris/HCl pH 10,4, 10% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM Tris/HCl pH 10,4, 10% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 9,4, 40 mM $\epsilon$ -Capronsäure, 10 % (v/v) Methanol

Weitere verwendete Puffer und Lösungen sind bei der entsprechenden Methode angegeben.

#### 2.1.4 Kits und Standards

Proteingrößenstandard, Benchmark	Invitrogen, Eggenstein
DNA-Größenstandard, 1kb+	Invitrogen, Eggenstein
4 × Probenauftragspuffer, reduzierend	Roth, Karlsruhe
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Omniskript™ Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Cell Titer Glo™, Proliferationsassay	Promega, Heidelberg
BrdU Labeling and Detection Kit	Boehringer, Mannheim

#### 2.1.5 Zellkulturreagenzien

DMEM, 4500 mg/l D-Glukose, 110 mg/l Na-Pyruvat	BioWhittacker, Verviers (Belgien)
RPMI 1640, 4500 mg/l D-Glukose, 110 mg/l Na- Pyruvat	BioWhittacker, Verviers (Belgien)
L-Glutamin	PAA, Pasching
Interferon alpha (1000 U)	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching
Isoton II	Becton Dickinson, Heidelberg
PBS (1×)	PAA, Pasching
Polybrene	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Eggenstein
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Eggenstein
Retronektin (50µg/ml)	Takara, Shiga, Japan

## 2.1.6 Antikörper

<b>Spezifität</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Hersteller</b>
STAT1 (sc-417)	WB 1:1000	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnologie
STAT1 (sc-346)	EMSA 25 ng/μl WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie
STAT3 (sc-482)	EMSA 20 ng/μl WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie
STAT5	WB 1:1000	monoklonal, Kaninchen	Transduction Laboratories
STAT5A	WB 1:10000	polyklonal, Kaninchen	Research & Development
STAT5B	WB 1:10000	polyklonal, Kaninchen	Research & Development
STAT6	EMSA 20ng/μl WB 1:1000	monoklonal, Maus	Transduction Laboratories
JAK2 (sc-294)	WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie
Bcl-2	WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Alexis, Grünberg
PARP	WB 1:5000	monoklonal, Maus	Pharmingen
Caspase-3 (sc-7148)	WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie
Caspase-8	WB 1:1000	monoklonal, Maus	Cell Signaling
Caspase-9	WB 1:500	polyklonal, Kaninchen	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
p65 (NFκB) (sc-8008)	EMSA 25 ng/μl WB 1:1000	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnologie
p50(NFκB) (sc-7178)	EMSA 25 ng/μl WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie
SOCS1 (sc-7005)	IH 1:100	polyklonal, Schaf	Santa Cruz Biotechnologie
SOCS3	IH 1:100	polyklonal, Kaninchen	J.Zhang, Walter and Eliza Hall Institute, Australia
phospho-STAT1 (tyr 701)	WB 1:500	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnologie
phospho-STAT3 (tyr 705)	WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling
phospho-STAT5 (tyr 694)	WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling
phospho-JAK2 (tyr 1007/1008)	WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling
phospho-ERK 1/2	WB 1:1000	monoklonal,	Cell Signaling

(thr 202/tyr 204)		Maus	
phospho-AKT (ser 473)	WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling
c-Flip	WB 1:500	monoklonal Maus	Alexis, Grünberg
LNGFR	FACS 1:1000	monoklonal, Maus	Cedarlane Labs
FITC für LNGFR	FACS 1:500	monoklonal, Maus	Biodesign, Kennebrück
Aktin	WB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Sigma, Deisenhofen
Anti-Maus Ig-HRP	WB 1:1000	polyklonal, Schaf	Amersham Pharmacia
Anti-Kaninchen Ig- HRP	WB 1:1000	polyklonal, Esel	Amersham Pharmacia
Anti-Schaf Ig-HRP	WB 1:10000	polyklonal, Esel	Santa Cruz Biotechnologie

### 2.1.7 Zellen

<b>Zelllinie</b>	<b>Zelltyp</b>	<b>ATCC Nummer/ Referenz</b>	<b>Medium</b>
293T	humane fötale Nierenzelllinie, transformiert mit Adenovirus 5-DNA	CRL-1573	DMEM
L428	humane Hodgkin- Lymphomzelllinie, B-Zellursprung	DSMZ ACC 197	RPMI 1640
L1236	humane Hodgkin- Lymphomzelllinie, B-Zellursprung	DSMZ ACC 530	RPMI 1640
L540	humane Hodgkin- Lymphomzelllinie, B-Zellursprung	DSMZ ACC 72	RPMI 1640
HDLM2	humane Hodgkin- Lymphomzelllinie, T-Zellursprung	DSMZ ACC 17	RPMI 1640
KMH2	humane Hodgkin- Lymphomzelllinie, B-Zellursprung	DSMZ ACC 8	RPMI 1640



### 2.1.8 Bakterien

Für molekularbiologische Arbeiten, Klonierungen, DNA-Präparationen und zur Produktion retro/lentiviraler Vektoren wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Die Bakterien wurden in LB (Luria Bertani)-Medium kultiviert. Die Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert. Ampicillin wurde in der Konzentration 100  $\mu$ g/ml eingesetzt.

Stamm	Genotyp
DH5 $\alpha$	<i>endA1 hsdR17 (rk<sup>-</sup> mk<sup>-</sup>) supE44 thi<sup>-</sup> <math>\lambda</math><sup>-</sup> recA1 gyrA96 relA1 80dlacI<sup>q</sup>ZD M15</i>

### 2.1.9 Plasmide

Name	Verwendung	Referenz
pMX	retroviraler Expressionsvektor	(Onishi <i>et al.</i> , 1998)
pMX-IRES-LNGFR	retroviraler Expressionsvektor	diese Arbeit
pMX-SOCS1	humanes SOCS1 Expressionsplasmid	diese Arbeit
pMX-SOCS3	humanes SOCS3 Expressionsplasmid	diese Arbeit
pVIG-IRES	lentiviraler Expressionsvektor	K.Brocke-Heidrich, Uni-klinik Leipzig
pVIG-SOCS3	humanes SOCS3 Expressionsplasmid	diese Arbeit
pHIT 60	Verpackungsplasmid für pMX-Vektor	(Soneoka <i>et al.</i> , 1995)
pVSV-G	Verpackungsplasmid für pMX-Vektor	(Ory <i>et al.</i> , 1996)
pVIG	lentiviraler Expressionsvektor für siRNAs	(Brocke-Heidrich <i>et al.</i> , 2004)
pVIG-siSTAT3	Expression einer siRNA gegen humanes STAT3	K. Brocke-Heidrich, Uni-Klinik Leipzig
pVIG-siSTAT6	Expression einer siRNA gegen humanes STAT6	diese Arbeit
pVIG-scramble	Expression einer nicht spezifischen siRNA	diese Arbeit
pHIT-G	Verpackungsplasmid für pVIG-Vektoren	(Fouchier <i>et al.</i> , 1997)
delta sp2	Verpackungsplasmid für	(Schnell <i>et al.</i> , 2000)

	pVIG Vektoren	
pSUPER <sup>TM</sup>	Klonierungsvektor für siRNAs	Oligoengine <sup>TM</sup>
pSUPER-siSTAT6	Expressionsvektor	diese Arbeit
pSUPER-scramble	Expressionsvektor	diese Arbeit

### 2.1.10 Oligonukleotide

#### siRNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz	Gen	Referenznummer
siSTAT3	5'-cttcagacccgtcaacaaat	humanes STAT3	NM_003150
siSTAT6	5'-gatgtgtgaaactctgaac	humanes STAT6	BT 007380
scramble	5'-aacatgtcatgtgtcacatct	unspezifische Sequenz	Dharmacon, siRNA Design Center

#### Oligonukleotide für DNA-Bindungsversuche

Oligonukleotid	Sequenz
hSIE aus c-fos Promoter	5'-catttcccgtaaatc-3'
β-Kasein	5'-agatttctaggaattcaaatc-3'
Cε-Keimbahn	5'-gtcaacttccaagaacagaa-3'
NFκB	5'-agttgaggggacttcccaggc-3'

#### Klonierungsprimer

Name	Sequenz	PCR Parameter
SOCS1-BamHI SOCS1-SpeI	5'-cgggatccgccaccatggtacacac 5'-ggactagttaaactctggaa	50°C, 25 Zyklen
SOCS3-BamHI SOCS3-SpeI	5'-cgggatccgccaccatggtacccac 5'-ggactagttaaagcggggc	50°C, 25 Zyklen
LNGFR-for LNGFR-rev	5'-tcccccgggatgggggcaggt 5'-acgcgtcgacgatccccctgtt	55°C, 30 Zyklen

---

## Primer für die Real Time PCR

Name	Sequenz	PCR Parameter
SOCS1-for SOCS1-rev	5'-caccttcttggtgcgcg 5'-aagccatcttcacgctgagc	56°C, 45 Zyklen
SOCS3-for SOCS3-rev	5'-tcacccacagcaagttcccgc 5'-gttgacgggtcttccgacagagatgc	56°C, 45 Zyklen
c-Myc-for c-Myc-rev	5'-cacatcagcacaactacgcagcgc 5'-ctcaggactctgacactgtccaac	58°C, 45 Zyklen
c-Myb-for c-Myb-rev	5'-acaagcatgcgttgcaactc 5'-tgcgatcaaatacagaactc	58°C, 45 Zyklen
Trim22-for Trim22-rev	5'-ggatgccagcagctcatctcag 5'-ttcagcatcacgtccacccagtagt	58°C, 45 Zyklen
18S	5'-cggctaccacatccaagga 5'-ccaattacagggcctcga	56°C, 45 Zyklen

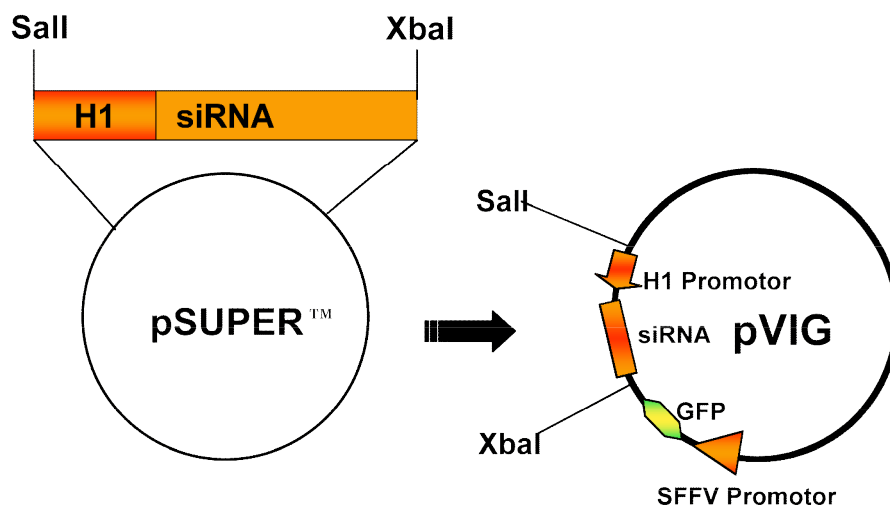
## Sequenzierprimer

Name	Vektor	Sequenz
pMX-1	pMX Vektoren	5'-tcgcagcttgatacacg
GFP-for	pVIG (siRNA)Vektoren	5'-atcactctcgcatggac
SFFV-for	pVIG-IRES Vektoren	5'-gcttctgctcccgagctc

## 2.2 Klonierungsstrategie für siRNAs (small interfering RNAs) im lentiviralen Vektor pVIG

Da eine transiente Transfektion der HL-Zelllinien nicht möglich war, wurde ein lentivirales Expressionssystem benutzt. Die STAT3-siRNA wurde von K. Brocke-Heidrich (Universitätsklinik Leipzig) bereitgestellt. Alle folgenden siRNAs wurden wie folgt kloniert: die siRNA-Sequenz wurde basierend auf der cDNA des Zielgens ausgewählt und mit Hilfe von überhängenden Restriktionsschnittstellen (BglII und HindIII) in den kommerziell erhältlichen Vektor pSUPER™ (Oligoengine) kloniert. Um eine lentivirale Expression der siRNA zu ermöglichen, wurde die siRNA zusammen mit dem H1-Promotor, der für die Expression der siRNA unerlässlich ist, mittels SalI und XbaI ausgeschnitten und in den lentiviralen Vektor pVIG kloniert.

Die korrekte Insertion der siRNAs wurde durch DNA-Sequenzierung (GFP-Primer) überprüft. Der lentivirale Vektor wurde mit Hilfe der Verpackungsplasmide (pHIT-G und delta sp2) in 293T-Zellen verpackt. Die Transduktionseffizienz wurde durch Ko-Expression von GFP (green fluorescent protein) unter der Kontrolle eines SFFV-Promotors (spleen focus forming virus) im FACS (Fluorescence aquired cell sorter) bestimmt. Eine schematische Darstellung der Klonierungsstrategie ist in Abbildung 2.2-1 gezeigt.



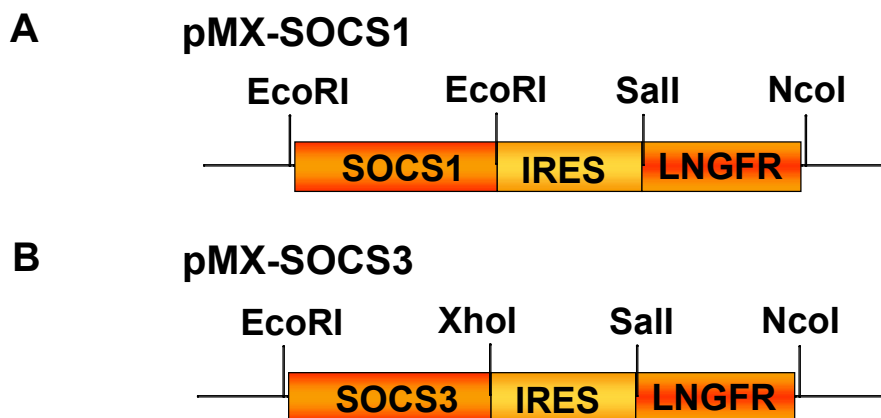
### Abbildung 2.2-1 Schematische Darstellung der siRNA-Klonierungsstrategie

Zur stabilen Expression von siRNAs in HL-Zelllinien wurde ein lentivirales Expressionssystem etabliert. Die siRNA (small interfering RNA) wurde basierend auf der cDNA-Sequenz ausgewählt und in den kommerziell erhältlichen Vektor pSUPER™ kloniert. Über die Schnittstellen Sall und XbaI wurde die H1-Promotor-siRNA-Kassette ausgeschnitten und in den lentiviralen Vektor pVIG kloniert. Dieser Vektor besitzt zur Kontrolle der Transduktionseffizienz einen GFP-Marker unter der Kontrolle eines SFFV-Promotors (spleen focus forming virus).

### 2.3 Klonierung von SOCS1 und SOCS3 in den retroviralen Vektor pMX-IRES-LNGFR

Zur Überexpression der JAK/STAT-Negativregulatoren SOCS1 und SOCS3 wurde der retrovirale Vektor pMX (Onishi *et al.*, 1998) verwendet. SOCS1 und SOCS3 wurden durch PCR (Polymerase-Kettenreaktion) generiert. SOCS1 (Abbildung 2.3-1 (A)) wurde über die EcoRI-Schnittstelle und SOCS3 (Abbildung 2.3-1 (B)) über die EcoRI- und XhoI-Schnittstellen in den pMX-Vektor inseriert. Die korrekte Insertion beider Konstrukte wurde durch DNA-

Sequenzierung mit dem pMX-1-Primer bestätigt. Zur Kontrolle der Transduktionseffizienz wurde der LNGFR (low affinity nerve growth factor receptor)-Marker mittels PCR generiert und in die Sall- und NcoI-Schnittstellen des pMX-Vektors eingesetzt. Die SOCS1- und SOCS3-Transkripte und der LNGFR-Marker wurden durch den gleichen MLV-Promotor (murines leukemia virus) abgelesen, waren aber durch eine zweite ribosomale Bindestelle (IRES-Element (internal ribosomal entry site)) getrennt, so dass zwei getrennte Proteine entstehen. Die retroviralen Konstrukte wurden mit den entsprechenden Verpackungsplasmiden (pHIT-60 und pVSV-G) in 293T-Zellen verpackt. Die Abbildung 2.3-1 zeigt schematisch die Klonierungsstrategie von SOCS1 und SOCS3 in den Vektor pMX.



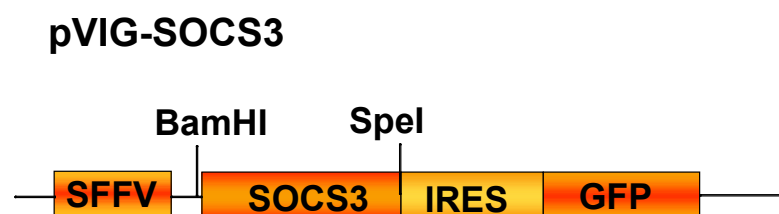
**Abbildung 2.3-1 Schematische Darstellung der SOCS1- und SOCS3-Klonierungsstrategie**

Die SOCS1- und SOCS3-cDNAs wurden zur stabilen Expression in den retroviralen Vektor pMX-IRES-LNGFR kloniert. Beide Transkripte wurden per PCR generiert. SOCS1 wurde in die EcoRI-Schnittstelle (A) und SOCS3 in die EcoRI- und XhoI-Schnittstelle (B) des pMX-Vektors kloniert. Als Marker wurde LNGFR (low affinity nerve growth factor receptor) verwendet. Die SOCS-cDNAs und das Markergen wurden durch den gleichen Promotor abgelesen, waren aber durch eine zweite ribosomale Bindestelle (IRES-Element) getrennt, so dass kein Fusionsprotein entstand.

---

## 2.4 Klonierung von SOCS3 in den lentiviralen Vektor pVIG-IRES

Der Nachweis von überexprimiertem SOCS1 und SOCS3 im retroviralen System beruht auf dem Nachweis des LNGFR-Markers. Für diesen Nachweis ist eine Färbung mit einem LNGFR-spezifischen Antikörper nötig. Ein sekundärer FITC-gekoppelter Antikörper ermöglicht dann die Detektion im FACS. Um Nebeneffekte durch eine Antikörperfärbung zu vermeiden wurde zunächst das SOCS3-Konstrukt in den lentiviralen Vektor pVIG-IRES umkloniert. Im Gegensatz zu dem bisher verwendeten pMX-Vektor enthält der pVIG-IRES-Vektor einen GFP-Marker. Dieser kann ohne vorherige Färbungen direkt im FL1-Kanal des FACS nachgewiesen werden. Die SOCS3 cDNA wurde per PCR aus dem Vektor pMX-SOCS3 amplifiziert und über die angehängten Schnittstellen BamHI und SpeI in den Vektor pVIG-IRES eingefügt. Die SOCS3 cDNA im lentiviralen Vektor (pVIG-IRES) steht unter der Kontrolle eines SFFV-Promotors (spleen focus forming virus). Dieser Promotor ist für die Expression in hämatopoetischen Zellen, sowie insbesondere für B-Zellen optimiert (Werner *et al.*, 2004). Im Unterschied zu dem pVIG-Vektor der zur Expression der siRNAs verwendet wurde, enthält dieser Vektor ein zusätzliches IRES-Element, dass die Generation zweier getrennter Proteine ermöglicht. Abbildung 2.4-1 zeigt eine schematische Darstellung der Klonierungsstrategie.



**Abbildung 2.4-1 Schematische Darstellung der Klonierung von SOCS3 in den lentiviralen Vektor pVIG-IRES**

Die SOCS3-cDNA wurde mittels PCR aus dem retroviralen Vektor pMX-SOCS3-LNGFR amplifiziert und über angehängte BamHI- und SpeI-Schnittstellen in den lentiviralen Vektor pVIG-IRES eingefügt. Die korrekte Insertion des Transkripts wurde durch DNA-Sequenzierung (SFFV-Primer) bestätigt. Sowohl SOCS3, als auch GFP wurden durch den SFFV-Promotor abgelesen, waren aber durch eine zweite ribosomale Bindestelle (IRES-Element) getrennt. Daraus resultierten zwei getrennte Proteine.

---

## **2.5 Methoden**

### **2.5.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur**

Alle Zellen wurden bei 37°C und einer Luftfeuchte von 90%, sowie einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% (v/v) kultiviert. Für Inhibitorstudien wurden 1x10<sup>7</sup> Zellen mit 100 µM AG490 (Tocris) und 10 µM Cucurbitacin I (Roth) behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem gleichen Volumen 100% Ethanol behandelt, da Ethanol als Lösungsmittel für die Inhibitoren verwendet wurde.

#### **2.5.1.1 Zellzahlbestimmung mittels COULTER COUNTER**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 1/20 mit Isoton II verdünnt. Mit Hilfe des Coulter Counters (Becton Dickinson) wurde die Partikelanzahl bestimmt. Die Ausschlußgröße lebender Zelle beträgt 5-18 µm.

#### **2.5.1.2 Passagieren von Zellen**

Zum Passagieren von adhärenenten Zellen wurden diese zunächst 1x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 37°C mit Trypsin/EDTA abgelöst und in serumhaltigem Medium resuspendiert. Die gewünschte Zellzahl wurde auf neue Platten überführt.

Suspensionszellen wurden durch Verdünnen der Zellsuspension mit frischem Medium in neue Zellkulturflaschen passagiert.

#### **2.5.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Das Zellsediment einer abtrypsinierten Zellpopulation wurde zunächst in PBS gewaschen und anschließend in Einfriermedium (90% (v/v) FKS, 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und bei -20°C eingefroren. Einen Tag später wurden die Zellen von -20°C in -80°C

---

überführt. Die Lagerung erfolgte in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei  $-120^{\circ}\text{C}$ . Zum Auftauen wurden die Zellen in einem  $37^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad kurz inkubiert und anschließend in vorgewärmtem Medium resuspendiert. Um das DMSO zu entfernen wurden die Zellen noch einmal mit Medium gewaschen und anschließend in einer Zellkulturflasche ausgesät.

#### **2.5.1.4 Transiente Transfektion von Zellen mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation zur Produktion von Viruspartikeln**

##### **Lösungen:**

##### **- Lösung A :**

0,5 M  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM HEPES, pH 6,95 eingestellt mit NaOH, sterilfiltriert

##### **- Lösung B :**

50 mM HEPES, 0,29 mM NaCl, 0,75 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,95, sterilfiltriert

Die Retro/Lentiviren die zur Transduktion von Hodgkin-Lymphomzelllinien verwendet wurden, wurden durch Ko-Transfektion von einem Plasmid das die Polymerase von MLV (murines leukemia virus) konstitutiv exprimiert sowie einem Plasmid, das das G-Glyko-Hüllprotein des vesikulären Stomatitis-Virus enthält und dem gewünschten Expressionsplasmid erzeugt.

293T-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Zelldichte von  $3 \times 10^6$  Zellen auf einer 10 cm-Platte ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte 3 Stunden vor der Transfektion. Für jede 10 cm-Platte wurden 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-DNA eingesetzt. Die Gesamt-DNA besteht aus 10  $\mu\text{g}$  lentiviralem oder retroviralem Vektor mit den jeweiligen Verpackungsplasmiden. Für die lentiviralen Vektoren wurden die Verpackungsplasmide delta sp2 (6,5  $\mu\text{g}$ ) und pHIT-G (3,5  $\mu\text{g}$ ) eingesetzt. Für die retroviralen Vektoren wurden die Verpackungsplasmide pHIT-60 (6,5  $\mu\text{g}$ ) und pVSV-G (3,5  $\mu\text{g}$ ) benutzt. Der Transfektionsansatz setzt sich zusammen aus DNA-Gemisch in 240  $\mu\text{l}$  Wasser, 240  $\mu\text{l}$  Lösung A und 480  $\mu\text{l}$  Lösung B. Nach Zugabe der Lösung A wird der Ansatz zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor anschließend Lösung B bei gleichzeitigem Vortexen zugegeben wird. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Präzipitate auf die Zellen getropft.



---

Die Kristalle wurden nach 16 Stunden Inkubation durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Viruspartikel-enthaltende Kulturüberstand entfernt und sterilfiltriert. Der Virusüberstand wurde entweder direkt zur Transduktion eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

#### **2.5.1.5 Transduktion von Zellen**

Retro- und lentivirale Transduktionen wurden gleichermaßen ausgeführt. Die zu transduzierenden Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen in einer 12-Lochplatte ausgesät. Das Volumen der Zellsuspension beträgt ca. 200-300  $\mu$ l. Der aufgetaute und getiterte Virusüberstand wurde mit einer MOI (multiplicity of infection) von 20 (L428, L1236) bzw. 30 (L540) zugegeben. Der Überstand wurde zusätzlich mit 4 mg/ml Polybrene versetzt. Die Zugabe von Polybrene fördert die Anheftung der Viruspartikel an die Zellen. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert und anschließend für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Transduktionsansätze mit 1 ml frischem Medium versehen und über Nacht weiterkultiviert. Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte mittels FACS-Analyse.

#### **2.5.1.6 Titerbestimmung**

Zur Bestimmung der Virustiter, sowie der MOI (multiplicity of infection) wurden  $1 \times 10^5$  293T-Zellen in einem Kulturvolumen von 500  $\mu$ l in einer 24-Lochplatte ausgesät. Nach Anheftung der Zellen (ca. 24 Stunden später) wurde der Virusüberstand einmal 1/100 verdünnt (5  $\mu$ l) und einmal 1/10 verdünnt (50  $\mu$ l) zugegeben. Der Ansatz wurde zusätzlich mit 4 mg/ml Polybrene versetzt. Nach 72 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse bestimmt. Der Virustiter und die MOI wurden nach folgender Formel (Stefan Stein, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) errechnet:

---

$$2 \times 10^5 \text{ 293T-Zellen} \times \frac{(\text{Prozentsatz der GFP positiven Zellen})}{100} \times \text{Verdünnung} = Y \times 10^5$$

$Y \times 10^5$  entspricht dem Titer.

Die MOI ergibt sich aus dem Quotienten von Virustiter zu Zellzahl der Zielzellen.

#### **2.5.1.7 FACS (Fluorescence acquired cell sorting)-Analyse**

Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz wurde die Ko-Expression von GFP (green fluorescent protein) von Zellen, die mit Lentiviren transduziert worden waren, und die Ko-Expression von LNGFR (low affinity nerve growth factor receptor) von Zellen, die mit Retroviren transduziert worden waren, gemessen. Im Falle des GFP-Markers wurden die Zellen ( $1 \times 10^5$ ) 1x mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS resuspendiert. Die Detektion von GFP erfolgte im FL1- Kanal des FACS-Calibur oder FACS-Scan (Beckton Dickinson).

Zur Detektion von LNGFR wurden die Zellen ( $1 \times 10^5$ ) 1x mit PBS gewaschen, anschließend mit einem anti-LNGFR Antikörper (Cedarlane –Labs, 1:1000 in 200 µl PBS) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit dem entsprechenden FITC-gekoppelten Antikörper (1:500 in 200 µl PBS) 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach erneutem Waschen und Resuspendieren in 200 µl PBS wurden die LNGFR-positiven Zellen im FL1-Kanal des FACS-Calibur oder FACS-Scan detektiert.

#### **2.5.1.8 Vitalitätsbestimmung von Zellen**

##### **„Cell Titer Glo“™ (Promega)**

Zur Bestimmung der Vitalität von Zellen wurde der „Cell Titer Glo“™-Kit von Promega verwendet. In diesem Kit wird die Vitalität von Zellen durch Bestimmung des ATP-Umsatzes als Zeichen metabolischer Aktivität ermittelt.

---

Zu diesem Zweck wurden jeweils 1000 Zellen pro Vertiefung in eine 96-Lochplatte ausgesät. Die Messung der Vitalitätsrate erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Einzelne Messungen wurden in Triplikaten ausgeführt.

### **Bestimmung des BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin)-Einbaus (Boehringer Mannheim)**

#### **Lösungen:**

##### **-Fixierlösung:**

4% (v/v) Formaldehyd in PBS

##### **-Permeabilisierungslösung:**

0,1% (v/v) Triton X-100 in 0,1% (w/v) Trinatriumcitratdihydrat pH 7,0

##### **Moviol-Einbettlösung:**

2,4 g Moviol mit 6 g Glycerin 1h rühren. Zugabe von 6 ml Wasser, 2h rühren. Zugabe von 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5, 2h bei 50°C im Wasserbad rühren. Zentrifugation 5000g/15 Minuten, Lagerung bei -20°C.

$1 \times 10^5$  Zellen (transduziert oder als Kontrolle unbehandelt) wurden auf Retronektin- (50 µg/ml) beschichteten Deckgläschen ausgesät. Die Beschichtung der Deckgläschen mit Retronektin ermöglicht die Haftung von Suspensionszellen an den Deckgläschen. Nach 24 Stunden wurden die Deckgläschen 1x mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 1 ml Fixierlösung bei Raumtemperatur behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen 20 Minuten auf Eis mit der Permeabilisierungslösung (500 µl) behandelt. Nach weiteren drei Waschschriften mit PBS wurden die Zellen mit dem BrdU-Kit von Boehringer, Mannheim nach Herstellerangaben gefärbt. In replizierenden Zellen wird der BrdU- (5-Bromo-2'-desoxyuridin) Farbstoff eingebaut und die Zellen erscheinen nach Anregung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon) grün.

---

### 2.5.1.9 Zellzyklusbestimmung

#### **Lösungen:**

- 38 mM Natriumcitrat
- Propidiumjodidlösung (50 mg/ml)  
500 µg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 5 µg/ml RNase A
- 100% Ethanol, eiskalt

Eine Zellzyklusbestimmung ermöglicht einen quantitativen Nachweis von apoptotischen Zellen (subG1-Phase) in einer Zellpopulation. Zur Zellzyklusbestimmung wurden die Zellen zuerst in Ethanol fixiert. Diese Ethanolbehandlung ermöglicht die Aufnahme des DNA-Farbstoffes Propidiumjodid in die Zellen. Dazu wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 1x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die resultierenden Zellen durch tropfenweise Zugabe von 1 ml 100% eiskaltem Ethanol unter ständigem Vortexen resuspendiert. Danach wurden die Zellen über Nacht bei 4°C fixiert. Der Nachweis der einzelnen Zellzyklusphasen erfolgte mittels Propidiumjodidfärbung. Die fixierten Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml 38 mM Natriumcitrat 10 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 400 µl 38 mM Natriumcitratlösung resuspendiert und nach Zugabe von 5 µg/ml RNaseA (Roche) und 5 µg/ml Propidiumjodidlösung für 20 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert und anschließend im FACS-Calibur oder FACS-Scan im FL-2 Kanal analysiert.

### 2.5.2 Proteinbiochemische Methoden

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Alle verwendeten Materialien und Puffer wurden auf 4°C temperiert.

#### 2.5.2.1 RIPA-Zellextrakte

#### **Lösungen:**

##### **- RIPA-Puffer:**

120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% Triton, 0,5% Deoxycholat, 0,1% SDS

##### **- Phosphatase-Proteaseinhibitoren:**

---

1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaP}_2\text{O}_7$ , 1 mM Pefabloc, 0,1 mM Benzamidin, 0,1 mM DTT, 10  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Pepstatin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin

Die Extrakte wurden für Immunfärbungen (Western Blot-Analyse) verwendet.

Die Zellen wurden in kaltem PBS 2x gewaschen und in einem entsprechenden Volumen (500  $\mu\text{l}$  für eine 10 cm-Platte) RIPA-Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation (15 Minuten, 10.000 rpm, 4°C) entfernt, das Lysat in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **2.5.2.2. Detergenz-freie Gesamtzellextrakte (WCE)**

##### **Lösungen:**

##### **- WCE-Puffer:**

20 mM Hepes/NaOH pH 7,9, 400 mM KCl, 20% (v/v) Glycerin, 0,1 M EDTA, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$

##### **- Phosphatase-Proteaseinhibitoren:**

10  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 250  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Pepstatin, 1 mM Pefabloc, 1  $\mu\text{g/ml}$  Pepstatin, 0,1 mM Benzamidin, 0,1 mM DTT

Die Detergenz-freien Gesamtzellextrakte wurden für Gelretardierungsexperimente (EMSA) verwendet. Die Zellen wurden 2x in kaltem PBS gewaschen. Nach einer Zentrifugation (5 Minuten, 2500 rpm, 4°C) wurde das Zellsediment in 3-5 Volumen (bezogen auf das Zellsediment) Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im 37°C-Wasserbad aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (10 Minuten, 12000 rpm, 4°C) abgetrennt und die Lysate in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### **2.5.2.3 Kalorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den verschiedenen Extrakten wurde mit Hilfe eines BSA-Standards (10 mg/ml) eine Eichgerade erstellt (Bradford, 1976). In einer 96-Lochplatte wurde BSA (bovine serum albumin) in einem Konzentrationsbereich von 0-5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in 150  $\mu\text{l}$  Wasser vorgelegt. Von

---

den zu bestimmenden Proteinextrakten wurde jeweils 1 µl zu 149 µl Wasser pipettiert. Nach anschließender Zugabe von 30 µl BioRad-Farblösung wurden die Proben nach fünf Minuten Inkubation bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch vermessen. Anhand des BSA-Standards und der daraus resultierenden Regressionsgerade wurde die Konzentration der einzelnen Proben ermittelt.

#### **2.5.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

##### **Lösungen:**

###### **- 4x Sammelgelpuffer:**

0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6,8

###### **- 4x Trenngelpuffer:**

1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS pH 8,8

###### **- 10x SDS-Laufpuffer:**

1,92 M Glycin, 0,248 M Tris-HCl, 10 g/l SDS

##### **Gelzusammensetzung:**

###### **- 10% Trenngel:**

5 ml 30% (w/v) Acrylamid

3,75 ml 4x Trenngelpuffer

6,25 ml Wasser

50 µl APS (100g/l)

10 µl TEMED

###### **- 4% Sammelgel:**

0,65 ml 30% (w/v) Acrylamid

1,25 ml 4x Sammelgelpuffer

3,05 ml Wasser

25 µl APS (100g/l)

5 µl TEMED

Für die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches nach dem Molekulargewicht (Laemmli, 1970) wurde das mini-Protean II Gelelektrophoresesystem von BioRad, München verwendet. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele erfolgte nach dem Protokoll von Sambrock (1989). Als Laufpuffer wurde 1x SDS-Laufpuffer (siehe Lösungen 2.1.3) verwendet. Das zu untersuchende Proteingemisch wurde mit 4x SDS-Probenpuffer (siehe Lösungen 2.1.4) gemischt, fünf Minuten bei 95°C

---

erhitzt und anschließend in die Taschen des Sammelgels geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 70-120 Volt.

### 2.5.2.5 Western-Blot und Immunodetektion

#### Lösungen:

##### - Kathodenpuffer:

25 mM Tris/HCl pH 9,4, 40 mM  $\epsilon$ -Capronsäure, 10 % (v/v) Methanol

##### - Anodenpuffer I:

300 mM Tris/HCl pH 10,4, 10% (v/v) Methanol

##### - Anodenpuffer II:

25 mM Tris/HCl pH 10,4, 10% (v/v) Methanol

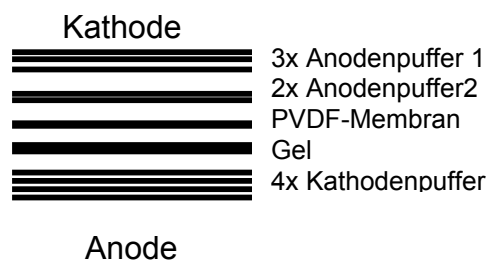
##### - TBST:

10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20

##### - Blockierlösung

2-5% (w/v) Magermilchlösung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben wurde das Proteingemisch mittels Elektrotransfer auf eine Membran übertragen. Zu diesem Zweck wurde eine PVDF-Membran und Blottingpapiere von Schleicher und Schüll verwendet. Der Proteintransfer erfolgte in einem Halb-Trockenblotgerät (semi-dry) von PeqLab (Erlangen) mittels eines Puffersystems bestehend aus Kathodenpuffer, Anodenpuffer I und Anodenpuffer II. Der Transfer erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde bei  $5 \text{ mA/cm}^2$ . Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:



Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die Membran wurden die freien Bindestellen mittels Blockierlösung in TBST abgedeckt. Zur Detektion der einzelnen Proteine wurden die entsprechenden Antikörper jeweils über Nacht in 2-5 % Magermilch (in TBST) bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Durch nachfolgende Waschschriffe (3 x 5 Minuten in TBST) wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Die anschließende Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten

---

Zweitantikörper erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur ebenfalls in 5% Magermilchlösung in TBST. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion mit Hilfe des ECL plus Western Blotting Detection Systems von Amersham Biosciences. Die Signale wurden auf einem Röntgenfilm (Super RX, Fuji Film) detektiert.

#### **2.5.2.6 Entfernen gebundener Antikörper (Strippen) von Membranen**

##### **Lösungen:**

##### **- Strippinglösung:**

62,5 mM Tris pH 6,7, 2% SDS, 1,8 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

An eine Membran gebundene Antikörper wurden durch Inkubation in 20 ml Stripping-lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur entfernt. Vor erneuter Antikörperzugabe wurde die Membran jeweils 10 Minuten in TBST bei Raumtemperatur gewaschen und erneut in 5% Magermilchlösung in TBST blockiert.

#### **2.5.2.7 Gelretardierungsanalyse (EMSA) (Yu *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1997)**

##### **Lösungen:**

##### **- Bindepuffer:**

10 mM Hepes pH 7,9, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM DTT, 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l poly(dI/dc), 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA

##### **- natives 5% (v/v) Polyacrylamidgel:**

26 ml H<sub>2</sub>O, 815  $\mu$ l 10xTBE, 1,65 ml 50% (v/v) Glycerin, 40% (39:1) Acrylamidlösung, 81  $\mu$ l 30% APS, 18,8  $\mu$ l TEMED

##### **- 10x Inkubationspuffer:**

100 mM Hepes (pH 7,9), 500 mM KCl, 10 mM EDTA

##### **- Fixierlösung:**

10% (v/v) Eisessig, 10% (v/v) Methanol

##### **- 10x TBE:**

890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0

Um die DNA-Bindefähigkeit von Proteinen zu testen wurden detergenzfreie WCE-Extrakte verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase radioaktiv markiert. Hierzu wurden 200 ng



---

doppelsträngige Oligonukleotide mit 7,5 µl  $\gamma^{32}$ -ATP, 3 µl Polynukleotid-Kinasepuffer und 4 µl T4-Polynukleotid-Kinase für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt und der Reaktionsansatz auf 50 µl mit Wasser aufgefüllt. Um nicht eingebautes ATP von der markierten Sonde zu trennen, wurden diese über Micro-Spin Säulen von Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben gereinigt. Das Endvolumen wurde auf 200 µl eingestellt. Die Einbaurate der markierten Sonde wurde mit Hilfe eines Szintilisationsgerätes bestimmt. Dazu wurde 1 µl Sonde mit 4 ml Szintilisationscocktail vermischt. 5-8 µg Gesamtzellextrakt oder Kernextrakt wurden mit 50000 cpm (counts per million) des markierten Oligonukleotides in Bindepuffer für 20 Minuten inkubiert. Um die Zusammensetzung der Protein/DNA-Komplexe zu bestimmen wurde noch ein spezifischer Antikörper zu dem Bindungsansatz gegeben. Durch gebundene Antikörper ist die Mobilität der Komplexe reduziert. Das Protein-DNA-Gemisch wurde anschließend über ein natives 5% (v/v) Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte mittels 0,25 x TBE-Laufpuffer bei 200 Volt. Nach dem Lauf wurde das Gel fixiert, getrocknet (1 Stunde, 80°C auf Filterpapier) und über Nacht auf einem Röntgenfilm mit Hilfe einer Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

#### **2.5.2.8 Immunhistochemische Färbungen von HL-Biopsien**

Die immunhistochemischen Färbungen der HL-Biopsien wurden von technischen Angestellten in der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann, Universitätsklinikum Frankfurt am Main durchgeführt und von Pathologen ausgewertet. Die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 2.1.6 aufgelistet.

---

## 2.5.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren und Klonierungstechniken

### 2.5.3.1 Präparation chemokompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)

#### Lösungen:

##### - LB-Medium:

10 g/l Kasein, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefextrakt in Wasser, autoklaviert

##### - Lösung 1:

150 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM CoAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 13% Glycerin, pH 5,8 sterilfiltriert, 4°C

##### - Lösung 2:

10 mM MOPS, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 13% Glycerin, pH 7,0, sterilfiltriert

500 ml einer DH5 $\alpha$ -Kultur wurden in LB (Luria Bertani)-Medium bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,5 angezogen. Die Bakterienkultur wurde anschließend zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 2200 rpm) und in 17 ml Lösung 1 resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation (10 Minuten, 4°C, 2200 rpm) wurde das Sediment in 12,5 ml Lösung 2 resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert (100  $\mu$ l) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 2.5.3.2 Transformation von Bakterien

#### Lösungen:

##### - LB-Medium:

10 g/l Kasein, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefextrakt in Wasser, autoklaviert

100  $\mu$ l chemokompetente DH5 $\alpha$ -Kultur wurden auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA (1  $\mu$ g) wurde zu den Zellen gegeben, vermischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert, um eine Anlagerung der DNA an die Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen für 1,5 Minuten im Wasserbad bei 42°C und nachfolgend für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Hitzeschock erlaubt das Eindringen der DNA in die chemokompetenten Zellen. Danach wurden die Zellen mit 500  $\mu$ l LB-Medium versetzt und 1 Stunde auf einem 37°C-Schüttler inkubiert. Letztlich wurden die Zellen auf LB-Platten mit Zugabe von Ampicillin (100  $\mu$ g/ml), zur Selektionierung der gewünschten Klone, ausplattiert.

---

#### **2.5.3.3 Analytische Plasmidisolierung (Mini-Präparation)**

Die Mini-Präparation von Plasmiden erfolgte basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Butanol-Fällung der isolierten DNA (Birnboim, 1983). 1,5 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurden in Eppendorf-Gefäße überführt und zentrifugiert (10000 rpm, 30 Sekunden, Raumtemperatur). Das geklärte Bakterienlysats wurde mit 1,5-fachen Volumen 6 M Guanidinisoithiocyanat und 2-fachem Volumen Butanol versetzt. Durch anschließende Zentrifugation (10 Minuten, 14000 rpm, Raumtemperatur) wurde die DNA gefällt. Nach zusätzlichem Waschen in 70% Ethanol wurde die DNA getrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert.

#### **2.5.3.4 Präparative Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)**

Zur präparativen Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* DH5α wurde der DNA-Maxi-Kit von Qiagen, Hilden verwendet. Die Gewinnung und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Nach entsprechenden Reinigungsschritten wurde die gewonnene DNA in einer entsprechenden Menge Wasser resuspendiert.

#### **2.5.3.5 Natriumacetat-Fällung von DNA**

Die zu fällende DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat-Lösung (5 M Natriumacetat) und 2 Volumen 100% eiskaltem Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (4°C, 14000 rpm, 20 Minuten) sedimentierte die DNA. Diese wurde nach zusätzlichem Waschen mit 70% Ethanol in einer entsprechenden Menge Wasser resuspendiert.

---

### **2.5.3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Bestimmung einer DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei entspricht  $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g DNA}$ .

Der Gesamtgehalt an DNA errechnete sich wie folgt:

Gemessene  $\text{OD}_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \mu\text{g DNA/ml}$

### **2.5.3.7 Restriktionsverdau mit Endonukleasen**

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurde 1-5  $\mu\text{g}$  DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym und zugehörigen Puffer nach Herstellerangaben (Puffer, Units Enzym, optimale Temperatur, Inkubationszeit) verdaut.

### **2.5.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA wurde die T4-DNA-Ligase und der Ligasepuffer der Firma New England Biolabs (NEB), Schwalbach benutzt. Die T4-DNA-Ligase ermöglicht die Bildung von Phosphodiester-Brücken zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe doppelsträngiger DNA. Die Ligation erfolgte in einem Endvolumen von 10  $\mu\text{l}$  nach Herstellerangaben über Nacht bei 16°C.

### **2.5.3.9 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (CIP)**

Um eine Selbstligation von linearisierten Plasmiden zu verhindern wurden die 5'-Enden der Plasmide mit alkalischer Phosphatase (CIP: calf intestine phosphatase) dephosphoryliert. Nach dem Restriktionsverdau wurden ohne Aufreinigung 0,5 Units alkalische Phosphatase pro  $\mu\text{g}$  DNA zugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

---

#### **2.5.3.10 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Um die Ligation zu ermöglichen wurden die überhängenden Enden der Fragmente oder die siRNA-Oligonukleotide mit Hilfe der Enzymaktivität der T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Diese Reaktion wurde entsprechend den Herstellerangaben (NEB, Schwalbach) unter Zugabe von 2 mM ATP durchgeführt.

#### **2.5.3.11 Auffüllen von 3'-Enden von DNA-Fragmenten mittels Klenow**

Zum Auffüllen von 3'-DNA-Enden wurde das Enzym Klenow verwendet. Bei diesem Enzym handelt es sich um das große Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*.

Die Reaktion wurde angewandt um die Ligation in Vektoren ohne überhängende Enden (blunt ends) zu ermöglichen. Die Reaktion wurde entsprechend den Herstellerangaben (NEB, Schwalbach) durchgeführt.

#### **2.5.3.12 Hybridisierung von komplementären einzelsträngigen DNAs**

##### **Lösungen:**

##### **- Annealingpuffer:**

100 mM Kaliumacetat, 30 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 2 mM Magnesiumacetat

Komplementäre DNA-Einzelstränge (Oligonukleotide zur Klonierung von siRNAs) wurden im Verhältnis 1:1 (10 µmol) in Annealingpuffer (30 µl) gemischt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 50 µl. Das DNA-Gemisch wurde 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend in einem heißen Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Die hybridisierte DNA wurde entweder direkt in die entsprechenden Vektoren (pSuper) ligiert oder bei -20°C gelagert.

---

### 2.5.3.13 Agarose-Gelelektrophorese

#### **Lösungen:**

##### **- 10x TAE:**

400 mM Tris/Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0

##### **- Agarosegel:**

1% (w/v) Agarose in 1x TAE, 2 µg/µl Ethidiumbromid

##### **- 10x Probenpuffer:**

25% (w/v) Ficoll, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol

Zur Analyse der Größe von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8 bis 1,2 % (w/v) 1x TAE-gepufferte Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer für Agarosegele wurde 1x TAE verwendet. Um die Detektion der einzelnen DNA-Fragmente zu ermöglichen wurden die Agarosegele vor dem Gießen mit 2 µg/µl Ethidiumbromid versetzt. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA-Struktur und erlaubt die Visualisierung der DNA auf einem UV-Transilluminator. Die DNA-Proben wurden mit 10x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 70-120 Volt. Als Größenstandard wurde der 1 kb+ Marker benutzt.

### 2.5.3.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Gelextraktionskit (Qiaquick) von Qiagen, Hilden verwendet.

### 2.5.3.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion benutzt. Die Reaktion wurde mit Hilfe spezifischer Oligonukleotid- Primerpaare und der thermostabilen DNA-Polymerase (z.B. von *Thermus aquaticus*, Taq-Polymerase) durchgeführt. Eine Standard-PCR wurde wie folgt angesetzt: 100 ng der Template-DNA wurden mit je 10 pmol der beiden Primer, 5 µl des entsprechenden 10x Puffers und 1 µl eines 10 mM dNTP-Gemisches vermischt. Das Gesamtvolumen einer solchen Reaktion

---

betrug 50 µl. Die Reaktion erfolgte in einer T-Gradient-PCR-Maschine von Whatman Biometra®, Göttingen. Nach einer 4-minütigen Inkubation bei 95°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 Units Vent®-DNA-Polymerase (NEB, Schwalbach) gestartet. Zur Amplifikation folgten 25-30 Zyklen mit: Denaturieren bei 95°C für 20 Sekunden, Hybridisieren bei 50-60°C (je nach Primerpaar) für 30 Sekunden und Synthese bei 72°C für 1 Minute pro 1 kb Amplifikat.

#### **2.5.3.16 RNA-Isolation aus Säugerzellen**

##### **Lösungen:**

##### **-DEPC-Wasser:**

0,2 % (v/v) DEPC in Wasser

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mittels Trifast™ der Firma Peqlab, Erlangen und des RNeasy-Kits der Firma Qiagen, Hilden nach Herstellerangaben. Die Elution der RNA erfolgte in DEPC-Wasser.

#### **2.5.3.17 Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte photometrisch. Dazu wurde 1 µl Gesamt-RNA 1/100 in DEPC-Wasser verdünnt und in einer Quarzküvette gemessen. Die Extinktion (optische Dichte OD) wurde bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht 1 OD<sub>260 nm</sub> = 33 µg/ml einzelsträngiger RNA.

#### **2.5.3.18 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)**

Alle Arbeiten mit RNA wurden auf Eis durchgeführt. Die reverse Transkription der RNA wurde mit Hilfe des Omniskript™ Reverse Transkriptase Kits der Firma Qiagen, Hilden durchgeführt. Zum Umschreiben von RNA in ein doppelsträngiges RNA-DNA-Molekül wurden 2 µg der isolierten Gesamt-RNA mit 200 ng Hexamer-Primern, 4 Units Omniskript™ Reverse Transkriptase, 10 Units RNase-Inhibitor (RNasin) in 1x RT-Puffer (Qiagen, Hilden) gemischt. Das

---

Gesamtvolumen der Reaktion betrug 20 µl. Folgendes PCR-Programm wurde zur Amplifikation eingesetzt: 1 Stunde 37°C, 5 Minuten 93°C (Hitzeinaktivierung des Enzyms).

#### **2.5.3.19 Quantitative RT-PCR (iCycler iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System)**

1-5 µl eines RT-PCR-Ansatzes wurden in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern eingesetzt. Um Schwankungen zu kompensieren wurden alle Ansätze in Triplikaten durchgeführt. Zur Transkriptquantifizierung wurde das iCycler Multi-Color Real Time PCR-Detektionssystem (Biorad), sowie der Absolute QPCR SYBR Green Mix (Abgene) verwendet.

#### **2.5.3.20 Auswertung der Real-Time PCR**

Die im iCycler gemessenen Daten wurden mit Hilfe der  $\Delta C_T$ -Methode (Biorad) ausgewertet. Dabei wird der erhaltene  $C_T$ -Wert des regulierten Gens (GOI= gene of interest) mit dem  $C_T$ -Wert eines nicht-regulierten Gens (HKG= house keeping gene) (z.B. 18S) nach folgender Formel errechnet um den relativen Expressionslevel zu bestimmen.

$$\text{Relative Expression} = 2^{-(S\Delta C_T - C\Delta C_T)}$$

$\Delta C_T$ : Differenz der  $C_T$ -Werte von reguliertem Gen (GOI) zu nicht-reguliertem Gen (HKG). ( $GOI\ C_T - HKG\ C_T$ )

$S\Delta C_T - C\Delta C_T$ : Differenz zwischen den regulierten Proben  $\Delta C_T$  ( $S\Delta C_T$ ) und der Kontrolle  $\Delta C_T$  ( $C\Delta C_T$ )



---

#### **2.5.3.21 Microarray-Analyse**

Zur Identifizierung eines komplexen Genexpressionsmusters wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann, Pathologie, Universitätsklinikum, Frankfurt am Main, eine Microarray-Analyse durchgeführt. Dazu wurde der „Human Genome Survey Microarray V2.0“ der Firma Applied Biosystems verwendet. Auf diesem Chip der zweiten Generation sind 32.878 Proben hybridisiert, die 29.098 Gene repräsentieren. Um eine größtmögliche Zuverlässigkeit der Daten zu erlangen wurde jede Probe auf zwei unabhängige Chips hybridisiert. Für die Analyse wurden 5 µg Gesamt-RNA (Rneasy-Kit) isoliert und aufgearbeitet. Die Proben wurden entsprechend den Herstellerangaben (Applied Biosystems) amplifiziert, markiert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden die Arrays prozessiert. Die Auswertung der Microarray-Analysen erfolgte durch Bioinformatiker in der Gruppe von Prof. Hansmann.

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Bedeutung der STAT-Proteine für das klassische Hodgkin-Lymphom

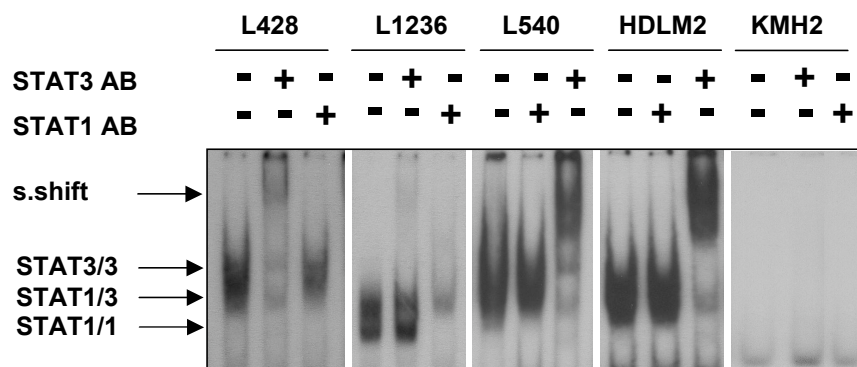
#### 3.1.1 Aktivierungsmuster von STAT-Proteinen in verschiedenen Zelllinien des klassischen Hodgkin-Lymphoms

Die Aktivierung verschiedener Proteine der STAT Familie, unter anderem STAT1, STAT3 und STAT6, wurde bereits für einige Zelllinien des klassischen Hodgkin-Lymphoms (HL) sowie für Hodgkin-Lymphom-Biopsien beschrieben (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2001b; Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002b). Dennoch bleibt die Rolle des JAK/STAT-Signalweges bei der Entstehung des malignen Phänotyps unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bedeutung einzelner STAT-Proteine für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde die Aktivierung von STAT1, 3, 5 und 6 in fünf verschiedenen Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms untersucht. Die verwendeten HL-Zelllinien lassen sich aufgrund von pathologischen Aspekten unterteilen in nodulär sklerotisierend (L428, L540, HDLM2) und gemischtzellig (L1236, KMH2) (Kuppers *et al.*, 2005). Die verwendeten Zelllinien sind bis auf eine Ausnahme B-Zellursprungs (HDLM2). Für die HDLM2-Zelllinie wird ein T-Zellursprung angenommen (Drexler *et al.*, 1986).

Die Aktivierung von STAT1, 3, 5 und 6 wurde zunächst mit Hilfe von Gelretardierungsexperimenten (EMSA) untersucht. Bei dieser Methodik wird die DNA-Bindung einzelner STAT-Moleküle an konservierte DNA-Sequenzen (Bindestellen) untersucht. DNA-Bindung von STAT-Molekülen ist nur im aktivierten Zustand, d.h. phosphoryliert möglich. Um die Aktivierung von STAT1 und STAT3 zu bestimmen wurde ein Bindungselement aus dem c-fos-Promotor (hSIE) verwendet. Diese Sequenz wird sowohl von STAT1, als auch von STAT3 gebunden. Die Zusammensetzung der einzelnen DNA-Protein-Komplexe wurde mit spezifischen Antikörpern gegen einzelne STAT-Proteine bestimmt. Die Bindung eines spezifischen Antikörpers resultiert in einer verringerten Mobilität des DNA-Protein-Komplexes. Abbildung 3.1.1-1 zeigt die DNA-Bindung von

STAT1 und STAT3 in den verschiedenen HL-Zelllinien. Konstitutiv aktives STAT3 konnte in L428-, L540- und HDLM2-Zellen und in geringen Mengen in L1236-Zellen detektiert werden. Das Gelretardierungsexperiment erlaubt des Weiteren Rückschlüsse über die Dimerbildung. STAT3/3-Homodimere werden ausschließlich durch Zugabe eines STAT3-Antikörpers in ihrer Mobilität verlangsamt. Bei STAT1/3-Heterodimeren bewirkt sowohl die Zugabe eines STAT1- oder eines STAT3-Antikörpers eine geringere Mobilität des Komplexes. Der Komplex aus STAT1/1-Homodimeren hat die größte Mobilität und wird durch Zugabe eines STAT1-Antikörpers im Gel zurückgehalten. Der Komplex aus STAT1/3-Heterodimeren läuft zwischen den STAT1/1- und STAT3/3-Homodimeren. In den L428-Zellen, sowie den L540- und HDLM2-Zellen ist der Hauptkomplex hauptsächlich aus STAT3/3-Homodimeren und nur zu einem geringen Anteil aus STAT1/3-Heterodimeren zusammengesetzt. Der Hauptkomplex in den L1236-Zellen besteht aus STAT1/1-Homodimeren, sowie einem geringeren Anteil aus STAT1/3-Heterodimeren. In den KMH2-Zellen konnte weder konstitutiv aktives STAT1 noch STAT3 im EMSA detektiert werden (Abbildung 3.1.1-1).

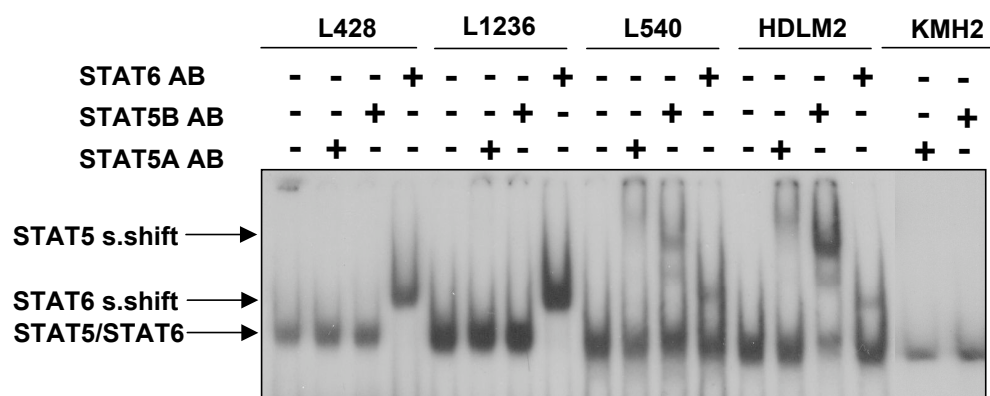


#### Abbildung 3.1.1-1 STAT1/STAT3-DNA-Bindung in HL-Zelllinien

Gesamtzellextrakte (8µg WCE) der verschiedenen HL-Zelllinien wurden mit einem radioaktiv markierten DNA-Bindungselement des c-fos-Promotors (hSIE) inkubiert und anschließend über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Konsensussequenz des hSIE-Elementes erlaubt die Bindung von aktiviertem STAT1 und STAT3. Die Zusammensetzung der Komplexe wurde durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern (AB) bestimmt (wie angezeigt). Die unterschiedliche Dimerbildung ist durch Pfeile gekennzeichnet. Zugabe eines spezifischen Antikörpers resultiert in einem Komplex mit geringerer Mobilität (s.shift).

Zur Untersuchung der STAT5/DNA-Bindung in den verschiedenen HL-Zelllinien wurde ein radioaktiv markiertes Bindungselement aus dem  $\beta$ -Kasein-Promotor verwendet (Abbildung 3.1.1-2). Nach Inkubation von Gesamtzellextrakten mit dem radioaktiven  $\beta$ -Kasein-Promotorelement ist auf dem Autoradiogramm ein distinkter DNA-Protein-Komplex zu erkennen. In den L428- und L1236-Zellen wurde dieser DNA-Protein-Komplex weder durch einen STAT5A-, noch durch einen STAT5B- Antikörper zurückgehalten. Da das Bindungselement eine Konsensussequenz enthält, an die sowohl STAT5, als auch STAT6 binden kann, wurden die Proben zusätzlich mit einem STAT6-Antikörper inkubiert. Dabei zeigte sich, dass der DNA-Protein-Komplex in den L428- und L1236-Zellen ausschließlich aus STAT6 bestand. In den L540-Zellen bestand der Komplex aus STAT5A, STAT5B und STAT6. In den HDLM2-Zellen bestand der Komplex aus STAT5A, STAT5B und STAT6. In den KMH2-Zellen bestand der Komplex aus STAT5A, STAT5B und STAT6.

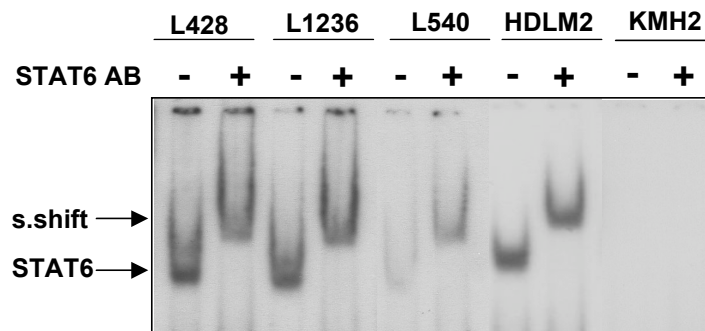
Hauptbestandteil des Komplexes in den HDLM2-Zellen war STAT5B. Er enthielt aber auch in geringeren Mengen STAT5A, sowie STAT6. In den KMH2-Zellen konnte keine STAT5-Bindung detektiert werden.



### Abbildung 3.1.1-2 STAT5/DNA-Bindung von HL-Zelllinien

8  $\mu$ g Gesamtzellextrakt (WCE) der verschiedenen Zelllinien wurden mit einem radioaktiv markierten DNA-Bindungselement aus dem  $\beta$ -Kasein-Promotor inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die Konsensussequenz erlaubt die Bindung von STAT5 und STAT6. Die Zusammensetzung der Komplexe wurde durch Zugabe von spezifischen Antikörpern (AB) bestimmt. Zugabe eines spezifischen Antikörpers resultiert in einem Komplex mit geringerer Mobilität (s.shift).

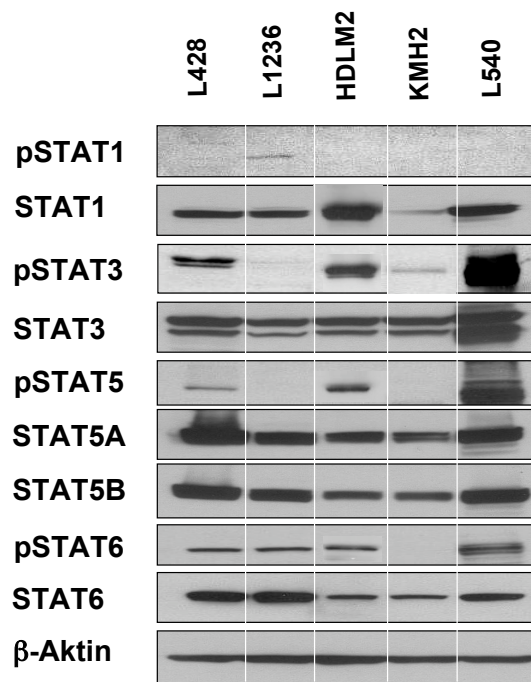
Zur spezifischen Untersuchung der STAT6/DNA-Bindung wurde eine Sequenz aus dem C $\epsilon$ -Keimbahn-Promotor verwendet (Abbildung 3.1.1-3). Vergleichbare Mengen an konstitutiv aktivem STAT6 bestätigten sich in L428- und L1236-Zellen. Weniger STAT6-Bindung war in L540- und HDLM2-Zellen detektierbar. In den KMH2-Zellen konnte kein konstitutiv aktives STAT6 identifiziert werden.



#### Abbildung 3.1.1-3 STAT6/DNA-Bindung von HL-Zelllinien

8 $\mu$ g Gesamtzellextrakt (WCE) der verschiedenen Zelllinien wurden mit einem radioaktiv markierten DNA-Bindungselement aus dem C $\epsilon$ -Keimbahn-Promotor inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zusammensetzung des DNA-Protein-Komplexes wurde durch die Zugabe eines spezifischen STAT6-Antikörpers (AB) bestimmt. Zugabe eines spezifischen Antikörpers resultiert in einem Komplex mit geringerer Mobilität (s.shift).

Zur Validierung der Ergebnisse aus den Gelretardierungsexperimenten wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis aktivierter STAT-Moleküle erfolgte mit Antikörpern, die speziell die phosphorylierte Form erkennen. Die Ergebnisse dieser Immunfärbungen mit Gesamtzellextrakten (RIPA) der verschiedenen HL-Zelllinien sind in Abbildung 3.1.1-4 dargestellt.



#### Abbildung 3.1.1-4 STAT-Aktivierung von HL-Zelllinien im Western Blot

60 µg RIPA-Extrakt der verschiedenen HL-Zelllinien wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die STAT-Proteine mit spezifischen Antikörpern, die entweder nur die phosphorylierte Form (pSTAT) oder die Gesamtmenge an STAT-Protein (STAT) erkennen, detektiert. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet.

Vergleichbare Mengen STAT5A, STAT5B und STAT6 wurden in allen fünf HL-Zelllinien detektiert. Große Mengen an konstitutiv aktivem STAT3α und β wurden in L428-, HDLM2- und vor allem in L540-Zellen nachgewiesen. Eine geringe Menge phosphoryliertes STAT3 wurde in den KMH2-Zellen detektiert. Entsprechend den Ergebnissen der Gelretardierungsexperimente wurde phosphoryliertes STAT1 nur in L1236-Zellen detektiert, obwohl die HDLM2-Zellen insgesamt die größte Menge Gesamt-STAT1 besaßen. Große Mengen phosphoryliertes STAT5 waren in L540-, sowie in HDLM2-Zellen und in geringeren Mengen in L428-Zellen nachweisbar. Der Aktivierungsstatus von STAT6 war in L428-, L1236- und HDLM2-Zellen vergleichbar, obwohl die HDLM2-Zellen weniger Gesamt-STAT6 aufwiesen als L428- und L1236-Zellen. In den L540-Zellen waren in der Immunfärbung mit einem Phospho-STAT6-Antikörper größere Mengen an phosphoryliertem STAT6 detektierbar, obwohl nur eine geringe STAT6/DNA-Bindung im EMSA detektiert wurde.

---

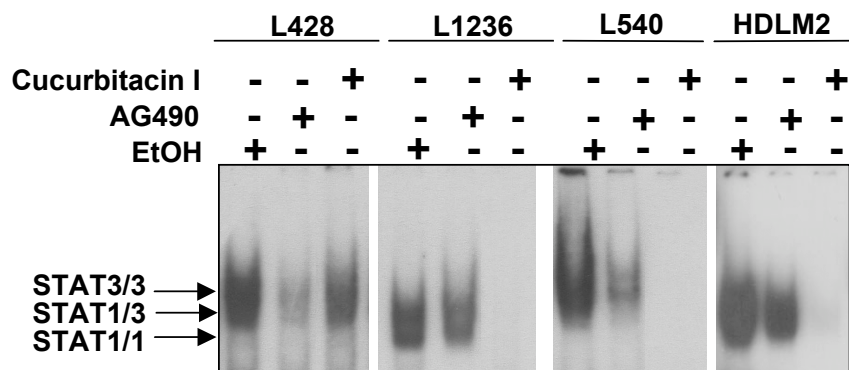
Entsprechend den Gelretardierungsexperimenten wurde kein konstitutiv aktives STAT1, 5 oder 6 in den KMH2-Zellen gefunden. Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass HL-Zelllinien unterschiedlich aktivierte STATs haben.

### **3.1.2 Hemmung der STAT-Aktivierung mit Hilfe von synthetischen Inhibitoren**

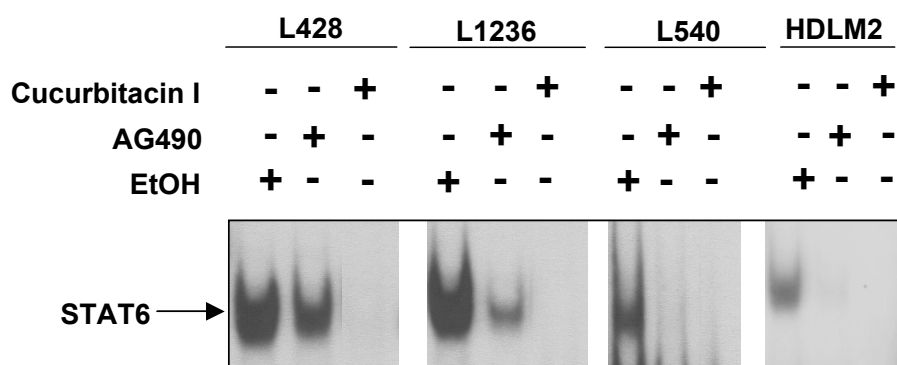
Um den Mechanismus der Aktivierung von einzelnen STAT-Molekülen, sowie deren Bedeutung für die HL-Zelllinien, genauer zu untersuchen wurden zwei verschiedene synthetische JAK-Kinaseinhibitoren eingesetzt. Der sehr gut charakterisierte JAK2-Inhibitor AG490 (Tocris), ein Tyrphostin, wurde bereits erfolgreich zur Hemmung von konstitutiv aktivem STAT3 in verschiedenen Zellsystemen eingesetzt (Meydan *et al.*, 1996; Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Burke *et al.*, 2001; Kube *et al.*, 2001). Der zweite verwendete Inhibitor, Cucurbitacin I (Roth) wird als spezifischer JAK2-Inhibitor beschrieben, der nicht JAK1-, SRC-, JNK-, AKT- oder ERK-Kinasen beeinflussen soll (Blaskovich *et al.*, 2003). Der Effekt der beiden Substanzen auf die Aktivierung der einzelnen STAT-Proteine wurde zunächst in Gelretardierungsexperimenten untersucht (Abbildung 3.1.2-5 A, B). Dazu wurden die zu testenden Zelllinien für 24 Stunden mit 100  $\mu$ M AG490 und 10  $\mu$ M Cucurbitacin I behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Ethanol, dem Lösungsmittel der beiden Inhibitoren, behandelt. Bei diesem Experiment wurden nur solche Zelllinien verwendet in denen STAT-Proteine aktiviert vorlagen (siehe Abbildung 3.1.1-1). EMSA-Experimente mit radioaktiv markiertem STAT1/3-Bindungselement (hSIE) (Abbildung 3.1.2-5, A) zeigten, dass Tyrphostin AG490 ein potenter Inhibitor der STAT3/DNA-Bindung in L428- und L540-Zellen ist. Weniger effizient blockierte AG490 die STAT3/DNA-Bindung in HDLM2-Zellen. Die STAT1/DNA-Bindung in L1236-Zellen blieb völlig unverändert. Cucurbitacin I hemmte die STAT3/DNA-Bindung in L428-Zellen leicht und verhinderte die STAT3/DNA-Bindung in L540- und HDLM2-Zellen vollständig. Ebenso wurde die STAT1/DNA-Bindung in den L1236-Zellen komplett gehemmt.

Gelretardierungsexperimente mit radioaktiv markiertem STAT6-Bindungselement (C $\epsilon$ -Keimbahn) zeigten, dass sowohl AG490, als auch Cucurbitacin I die DNA-Bindung von STAT6 in den verschiedenen HL-Zelllinien inhibierten (Abbildung 3.1.2-5 B). Die Hemmung der STAT6/DNA-Bindung durch Cucurbitacin I war in allen vier Zelllinien vergleichbar. Tyrphostin AG490 hemmte die STAT6/DNA-Bindung am stärksten in L1236-, L540- und HDLM2-Zellen und am schwächsten in L428-Zellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass unterschiedlich sensitive Aktivierungswege der STATs in den verschiedenen Zelllinien vorliegen.

**A**



**B**

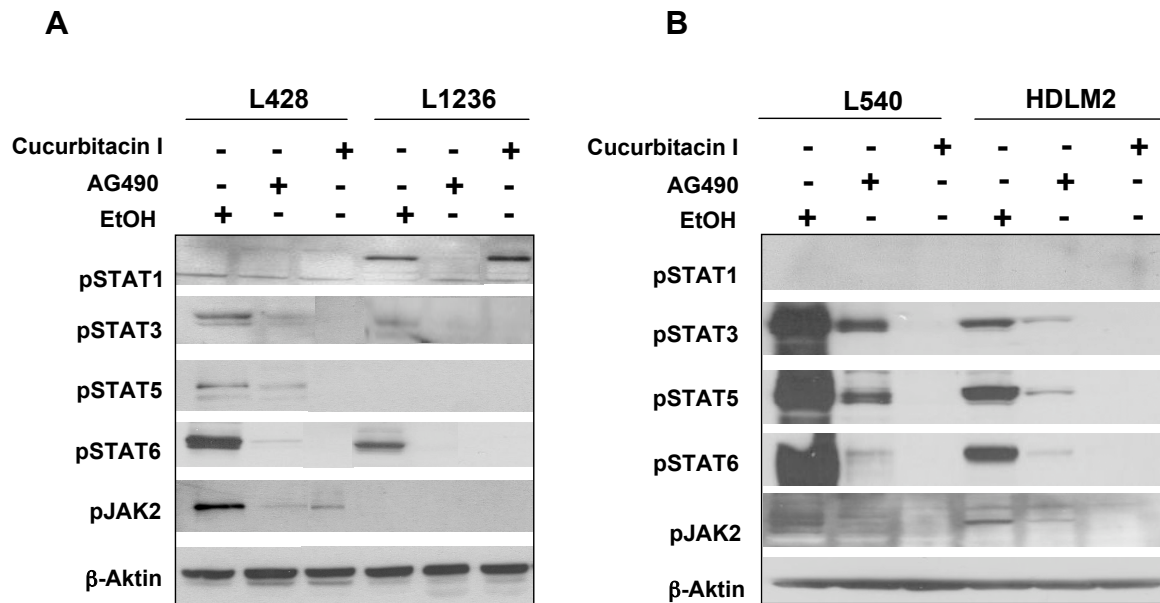


### Abbildung 3.1.2-5 Hemmung der STAT-Aktivierung mit synthetischen Inhibitoren

HL-Zelllinien wurden mit 100  $\mu$ M AG490, 10  $\mu$ M Cucurbitacin I oder Ethanol als Kontrolle für 24 Stunden inkubiert. Gesamtzellextrakte (WCE) der verschiedenen behandelten Zellen wurde mit einem radioaktiv markierten DNA-Element aus dem c-fos-Promotor (hSIE) inkubiert, um die STAT1/STAT3-Bindung (A) zu untersuchen oder mit einem radioaktiv markierten Element aus dem C $\epsilon$ -Keimbahn-Promotor, um die STAT6/DNA-Bindung (B) zu untersuchen.



Zur Bestätigung der EMSA-Ergebnisse wurde die Phosphorylierung und damit der Aktivierungsstatus der verschiedenen STAT-Proteine in der SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Immunfärbung überprüft. Der Nachweis einzelner aktivierter STAT-Moleküle erfolgte mit spezifischen Phospho-Antikörpern, die speziell gegen die aktivierte Form gerichtet sind. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet (Abbildung 3.1.2-6).



**Abbildung 3.1.2-6 Nachweis der Hemmung der STAT-Aktivierung im Western Blot**

HL-Zelllinien wurden für 24 Stunden mit den Inhibitoren AG490 (100 $\mu$ M) und Cucurbitacin I (10  $\mu$ M) behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen mit Ethanol (EtOH), dem Lösungsmittel der beiden Substanzen behandelt. Nach der Inkubation wurden RIPA-Extrakte hergestellt und jeweils 60  $\mu$ g elektrophoretisch aufgetrennt. Für die anschließende Immunfärbung wurden Antikörper verwendet, die spezifisch die aktivierte/phosphorylierte Form der einzelnen STAT-Proteine (pSTAT) erkennen. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Die HL-Zelllinien L428 und L1236 sind in (A) dargestellt, die Ergebnisse für die HL-Zelllinien L540 und HDLM2 sind in (B) dargestellt.

Die Immunfärbungen zeigten, dass beide Inhibitoren die Phosphorylierung von STAT3, STAT5 und STAT6 in allen vier Zelllinien hemmten. Im Gegensatz zu den EMSA-Experimenten inhibierte Cucurbitacin I die Phosphorylierung von STAT3 in L428-Zellen vollständig. In L1236-Zellen hemmte AG490 und nicht wie im Gelretardierungsexperiment Cucurbitacin I die STAT1-Aktivierung. Dies könnte darauf hinweisen, dass die DNA-Bindung nicht zwangsläufig von der Phosphorylierung des STAT1-Moleküls abhängt. Eine konstitutive Aktivierung der STATs ist meist die Folge von deregulierten übergeordneten Rezeptor-

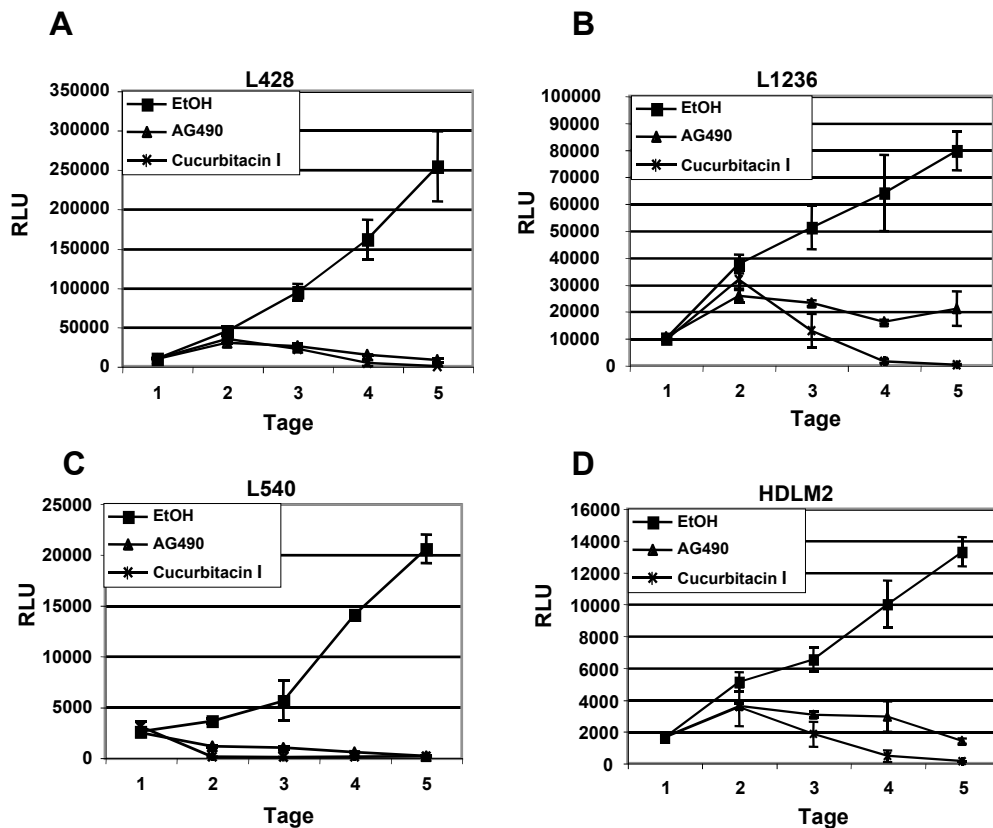
---

Tyrosinkinasen, wie z.B. EGFR-Tyrosinkinasen oder anderen zellulären Kinasen (z.B. SRC) (Sternberg *et al.*, 2004). Verantwortlich für die Aktivierung von STAT-Molekülen ist aber auch häufig die JAK2-Kinase. Aus diesem Grund wurde der Aktivierungsstatus der JAK2-Kinase mittels Immunfärbung mit einem Phospho-JAK2-spezifischen Antikörper getestet. In L428-Zellen und in geringerem Maße auch in HDLM2-Zellen konnte die aktivierte Form der JAK2-Kinase detektiert werden. In diesen beiden Zelllinien könnte die JAK2-Kinase für die Aktivierung von STAT3, 5 und 6 verantwortlich sein. Die Aktivierung der JAK2-Kinase wurde in diesen Zelllinien durch beide Inhibitoren gehemmt. Welche Kinase für die Aktivierung der STATs in den anderen HL-Zelllinien verantwortlich ist, ist noch nicht geklärt. Jedoch wurden im klassischen Hodgkin-Lymphom eine große Anzahl Tyrosin-Kinasen exprimiert (Renne *et al.*, 2005).

### **3.1.2.1 Einfluss von AG490 und Cucurbitacin I auf die Proliferation von HL-Zelllinien**

Um den Einfluss der Hemmung der STAT-Moleküle auf die Proliferation von HL-Zelllinien zu untersuchen, wurde ein auf Lumineszenz-basierendes Messsystem (Cell Titer Glo, Promega) verwendet. Bei diesem Messsystem wird der ATP-Umsatz basierend auf metabolischer Aktivität der Zellen bestimmt und mit der Proliferation der Zellen korreliert. Das heißt je größer der ATP-Umsatz, desto höher die metabolische Aktivität und damit die Proliferation der Zellen. Die Vitalität wird graphisch als RLU (relative light units) dargestellt. Es wurden jeweils 1000 Zellen pro Vertiefung in 96-Lochplatten ausgesät und in Gegenwart von AG490 (100  $\mu$ M) und Cucurbitacin I (10  $\mu$ M) für fünf Tage kultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Ethanol behandelt. Die graphische Auswertung der Messwerte in Abbildung 3.1.2.1-7 zeigt sehr deutlich, dass die Proliferation der vier getesteten Zelllinien bereits nach drei bis vier Tagen Behandlung sinkt. Die Vitalität der L1236-, L540- und HDLM2-Zellen sinkt nach vier Tagen unter den Ausgangspunkt des ersten Tages (Abbildung 3.1.2.1-7, B,

C, D). Die Proliferation der L428-Zellen geht wieder auf den Ausgangswert zurück (Abbildung 3.1.2.1-7, A).



### Abbildung 3.1.2.1-7 Einfluss von AG490 und Cucurbitacin I auf die Proliferation von HL-Zelllinien

Der Einfluss der Inhibitoren auf die Proliferation wurde mit einem auf Lumineszenz-basierenden Assay (Cell Titer Glo, Promega) untersucht. Dazu wurden 1000 Zellen pro Vertiefung (L428 (A), L1236 (B), L540 (C), HDLM2 (D)) ausgesät und über einen Zeitraum von fünf Tagen mit AG490 (100  $\mu$ M), Cucurbitacin I (10  $\mu$ M) oder Ethanol (EtOH) behandelt. Die Proliferation der Zellen wird aus dem Umsatz an ATP als Indikator für metabolische Aktivität ermittelt. Die Standardabweichung wurde aus drei Einzelwerten ermittelt.

---

### 3.1.2.2 Einfluss von AG490 und Cucurbitacin I auf den Zellzyklus von HL-Zelllinien

Ein konstanter oder rückläufiger ATP-Umsatz lässt keine Rückschlüsse zu, ob die Zellen in ihrem Wachstum arretiert sind oder sogar absterben. Um dies zu unterscheiden wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit den beiden Inhibitoren AG490 (100µM), Cucurbitacin I (10µM) oder Ethanol als Kontrolle für 24 und 72 Stunden inkubiert, danach für eine Zellzyklusanalyse fixiert und mit Propidiumjodid angefärbt. Diese DNA-Färbung ermöglicht mittels einer FACS-Analyse (Fluorescence acquired cell sorting) die Bestimmung der Absterberate basierend auf der Anzahl an Zellen in der subG1-Phase des Zellzyklus sowie die Detektion eines Zellzyklusarrestes. Ein Zellzyklusprofil erfasst den DNA-Gehalt einer Gesamtzellpopulation und lässt sich in vier Phasen einteilen: G0/G1-Phase, S-Phase, G2/M-Phase und subG1-Phase. Eine proliferierende Zellpopulation ist gekennzeichnet durch einen gewissen Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase (Ruhephase, quiescent). Aktiv teilende Zellen befinden sich in der G2/M-Phase (Mitose). Die S-Phase (Synthese) umfasst Zellen, die gerade ihren DNA-Gehalt verdoppeln und sich kurz vor der Mitose befinden. Der Anteil an Zellen mit fragmentierter DNA, d.h. die Menge an toten Zellen, wird im subG1-Bereich erfasst. Diese Methode ermöglicht damit die Bestimmung von Zellzyklusarrest und Zelltod.

Tabelle 3.1.2.2-1 zeigt eine Zusammenfassung der durchgeführten FACS-Messungen. Die gezeigten Werte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Behandlung mit Cucurbitacin I für 72 Stunden führte zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl von Zellen mit fragmentierter DNA (subG1-Phase) in allen vier Zelllinien (Tabelle 3.1.2.2-1, A-D). In den L540- und HDLM2-Zellen ist der Anteil sterbender Zellen (subG1-Phase) bereits nach 24 Stunden Behandlung mit Cucurbitacin I deutlich erhöht (Tabelle 3.1.2.2-1, C, D). Eine Behandlung der L428- und L1236-Zellen mit Cucurbitacin I für 24 Stunden beeinflusst den Zellzyklus kaum (Tabelle 3.1.2.2-1, A, B). Der JAK2-Inhibitor AG490 war in den L540-Zellen sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 72 Stunden am effektivsten (Tabelle 3.1.2.2-1, C). Eine deutlich erhöhte Anzahl toter Zellen nach AG490-Behandlung (nach 24 und 72 Stunden) ist ebenfalls in den HDLM2-Zellen zu beobachten (Tabelle 3.1.2.2-1, D). In den L428- und

---

L1236-Zellen war nach Inkubation mit AG490, sowohl nach 24 Stunden als auch nach 72 Stunden, nur ein leichter Anstieg an Zellen im subG1-Bereich des Zellzyklus zu beobachten (Tabelle 3.1.2.2-1, A, B). Allerdings ist die Anzahl an Zellen im G0/G1-Bereich der L428- und L1236-Zellpopulationen nach Behandlung mit AG490 für 24 Stunden erhöht (Tabelle 3.1.2.2-1, A, B). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die L540-Zellen für beide JAK-Inhibitoren am sensitivsten sind. Des Weiteren war ein Rückgang des ATP-Umsatzes und damit der Proliferation, nicht in allen Zelllinien mit Induktion von Zelltod zu korrelieren. Während Cucurbitacin I nach 72 Stunden in allen Zelllinien die Anzahl toter Zellen erhöhte (Tabelle 3.1.2.2-1, A-D), gab es Unterschiede bei der Behandlung mit AG490. L540- und HDLM2-Zellen waren sensibler für die Behandlung mit AG490 (nach 24 und 72 Stunden) und zeigten eine deutliche Erhöhung an Zellen mit fragmentierter DNA (subG1-Phase) (Tabelle 3.1.2.2-1, C, D). Ein Rückgang der Proliferation der L428- und L1236-Zellen nach AG490-Behandlung (24 und 72 Stunden) korrelierte nicht mit einer signifikant erhöhten Anzahl toter Zellen (Tabelle 3.1.2.2-1, A, B). Stattdessen waren die Zellen nach 24 Stunden AG490-Inkubation in der G0/G1-Phase arretiert (Tabelle 3.1.2.2-1, A, B).

**A****L428**

24h	Etoh	AG	Cu
GO/G1	47	59,5	46
S	27	28	28
G2/M	24	10	25,5
subG1	0,6	1,4	0,7
72h			
GO/G1	70	75	20
S	16,8	10	11
G2/M	8	6,2	4,20
subG1	3,2	5,7	62

**C****L540**

24h	Etoh	AG	Cu
GO/G1	51,7	36,5	34
S	15,4	3,9	13,3
G2/M	20	1,8	13,8
subG1	2,9	55,5	32,2
72h			
GO/G1	55	15,4	18,4
S	15	9,0	15,1
G2/M	17	0,9	5,5
subG1	3	73,0	54,1

**B****L1236**

24h	Etoh	AG	Cu
GO/G1	56	62,6	55
S	21	17	20
G2/M	15,7	15	14
subG1	3	4	5,6
72h			
GO/G1	72	63,2	33
S	14	17,5	10
G2/M	9,2	9,7	8
subG1	3,7	9,7	45

**D****HDLM2**

24h	Etoh	AG	Cu
GO/G1	50,3	53	44
S	14,1	12,6	11,1
G2/M	17,6	12,4	12,1
subG1	5,3	12,8	25,2
72h			
GO/G1	51,4	38,8	24,5
S	12,52	18,3	9
G2/M	17,3	18,7	8,0
subG1	3,67	13,5	47,6

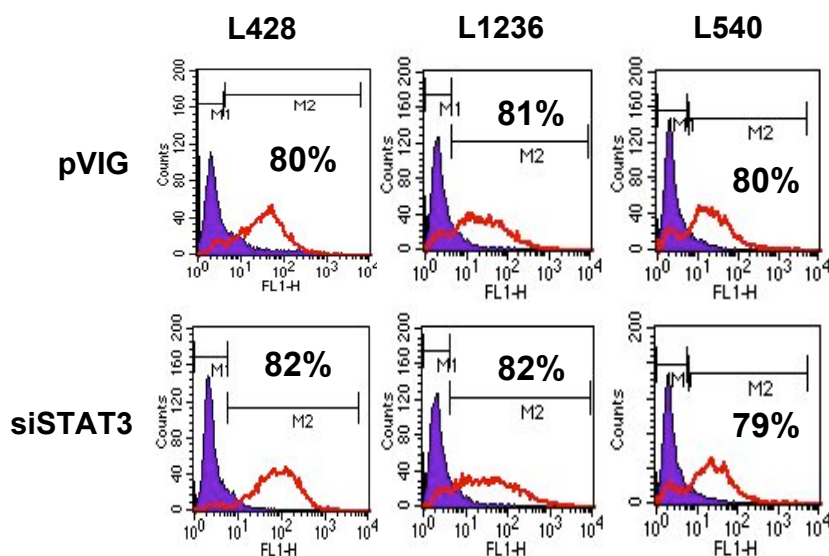
### **Tabelle 3.1.2.2-1 Einfluss der Inhibitoren auf den Zellzyklus von HL-Zelllinien**

Zur Erstellung eines Zellzyklusprofils wurden L428- (A), L1236- (B), L540- (C) und HDLM2- (D) Zellen mit 100 µM AG490 (AG), 10 µM Cucurbitacin I (Cu) oder als Kontrolle mit Ethanol (Etoh) behandelt. Die Zellen wurden nach 24 Stunden und 72 Stunden geerntet, fixiert und mit Propidiumjodid angefärbt. Der DNA-Gehalt wurde anschließend im FACS-Gerät detektiert. Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der prozentualen Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus.

### **3.1.3 Expression von siRNA gegen STAT3 in HL-Zelllinien**

Die Ergebnisse mit den synthetischen Inhibitoren bestätigen, dass der JAK/STAT-Signalweg eine wichtige Rolle für die Proliferation und das Überleben von HL-Zelllinien spielt. Trotzdem lassen die Ergebnisse in dieser Form keinen Schluss auf die Bedeutung einzelner STAT-Proteine zu, da die Inhibitoren in allen getesteten HL-Zelllinien immer mehr als nur ein STAT-Molekül hemmten. Um die Bedeutung einzelner STAT-Familienmitglieder, insbesondere STAT3, genauer zu untersuchen wurde deshalb eine siRNA (small interfering RNA) gegen STAT3 verwendet. Da eine transiente Transfektion von HL-Zelllinien nicht möglich war, wurde ein lentivirales

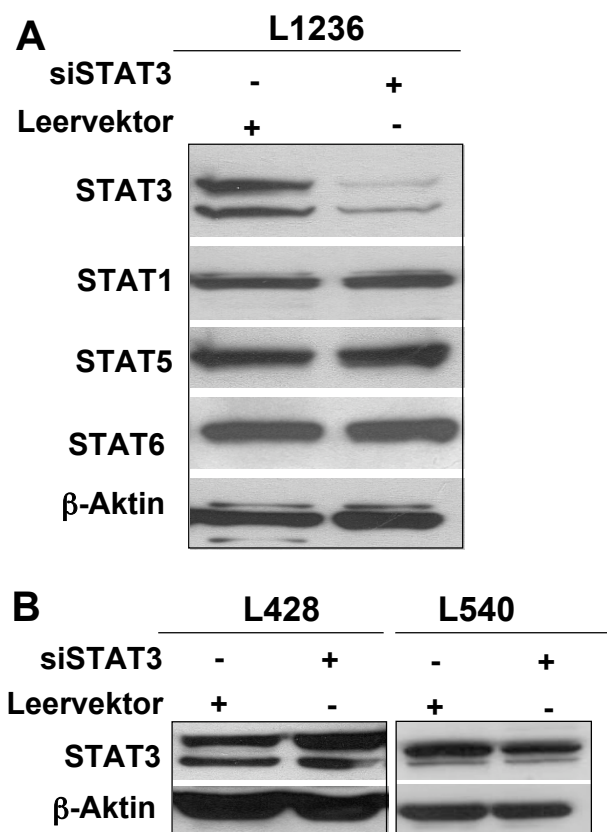
Expressionssystem benutzt. Der lentivirale Vektor enthält zusätzlich zur siRNA-Expressionskassette einen GFP (green fluorescent protein)-Marker unter der Kontrolle eines SFFV (spleen focus forming virus)-Promotors, der den Nachweis der Transduktionseffizienz im FACS-Gerät erlaubt. Als Kontrolle für die siRNA wurde entweder der leere Vektor (pVIG) oder eine nicht spezifische siRNA-Sequenz (scramble) verwendet. Zur Expression der STAT3-siRNA wurden die L428-, L1236- und L540-Zellen verwendet. Die HDLM2-Zellen ließen sich unter Standardbedingungen nicht ausreichend transduzieren. Die HL-Zelllinien wurden mit einer MOI (multiplicity of infection) von 20 (L428, L1236) oder 30 (L540) transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde basierend auf der Ko-Expression von GFP mit Hilfe des FACS-Gerätes detektiert. Abbildung 3.1.3-8 zeigt exemplarisch die Transduktionseffizienz in den drei verschiedenen HL-Zelllinien.



**Abbildung 3.1.3-8 Transduktionseffizienzen der STAT3-siRNA in HL-Zelllinien**

L428- und L1236-Zellen wurden mit einer MOI von 20, die L540-Zellen mit einer MOI von 30 transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde mit Hilfe des FACS-Gerätes, anhand der Ko-Expression von GFP bestimmt. Die Abbildung zeigt für jede HL-Zelllinie jeweils ein Beispiel einer solchen Transduktion. Für alle weiteren Experimente wurden nur Zellpopulationen verwendet, die mehr als 75% transduziert waren. Das violette Histogramm repräsentiert die GFP-negativen Kontrollzellen (M1). Das rote Histogramm kennzeichnet die GFP-positive Zellpopulation (M2). Die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozent ergibt aus der Anzahl der Zellen im M2-Profil.

Die Effizienz der STAT3-siRNA in verschiedenen Zelllinien (L428, L1236, L540) wurde im Western Blot mit einem STAT3-spezifischen Antikörper getestet. Abbildung 3.1.3-9, A zeigt, dass die STAT3-siRNA die Expression von STAT3 $\alpha$  und  $\beta$  in den L1236-Zellen sehr effizient hemmte. Die Expression der anderen STAT- Familienmitglieder blieb dabei unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die STAT3-siRNA die Gesamtmenge an STAT3 in den L428- und L540-Zellen nicht veränderte (Abbildung 3.1.3-9, B). Obwohl diese Zellen ausreichend transduziert werden konnten, war die siRNA nicht effizient genug um die Expression von STAT3 zu hemmen. Dies ist möglicherweise auf die große Menge an aktiviertem STAT3 in beiden Zelllinien zurückzuführen.



#### Abbildung 3.1.3-9 Effekt der STAT3-siRNA auf die STAT3-Expression in HL-Zelllinien

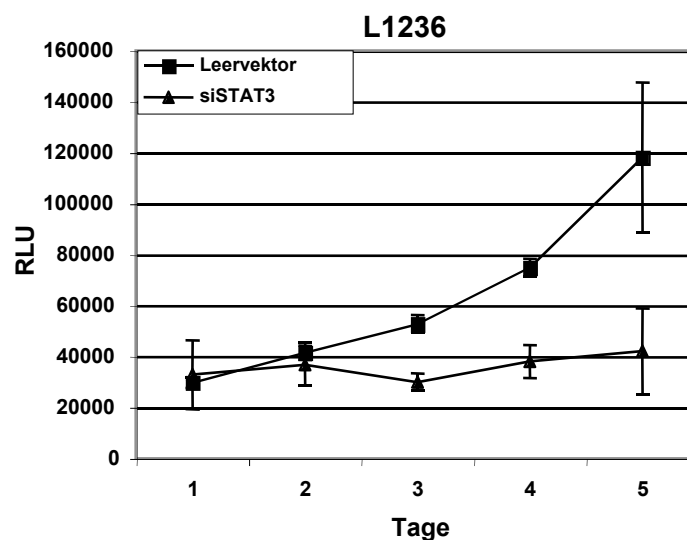
HL-Zelllinien wurden entweder mit der STAT3-siRNA (siSTAT3) oder dem Kontrollvirus (Leervektor) transduziert. Die Transduktion wurde auf der Basis der Ko-Expression von GFP im FACS-Gerät überprüft. 72 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen für einen RIPA-Extrakt geerntet. 30  $\mu$ g dieses Extraktes wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Immunfärbungen für die L1236-Zellen ist in (A), die Immunfärbungen für die L428- und L540-Zellen sind in (B) dargestellt. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.



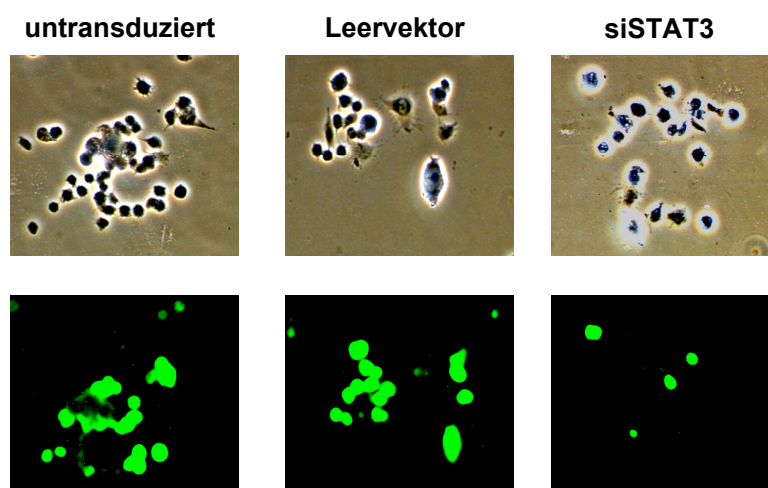
### 3.1.3.1 Effekt der STAT3-siRNA auf die Proliferation von L1236-Zellen

Um die Bedeutung von STAT3 für das Wachstum und das Überleben von L1236-Zellen zu testen, wurde die Proliferation der STAT3-siRNA- (siSTAT3) transduzierten bzw. Kontrollvirus (Leervektor)-transduzierten L1236-Zellen bestimmt. Die Proliferation, basierend auf metabolischer Aktivität dieser Zellen, wurde 72 Stunden nach der Transduktion für einen Zeitraum von fünf Tagen gemessen (Abbildung 3.1.3.1-10, A).

**A**



**B**



**Abbildung 3.1.3.1-10 Effekt der STAT3-siRNA auf die Proliferation von L1236-Zellen**

L1236-Zellen wurden mit STAT3-siRNA (siSTAT3) oder dem Leervektor transduziert. Die Transduktionseffizienz beider Vektoren wurden anhand der Ko-Expression von GFP im FACS-

---

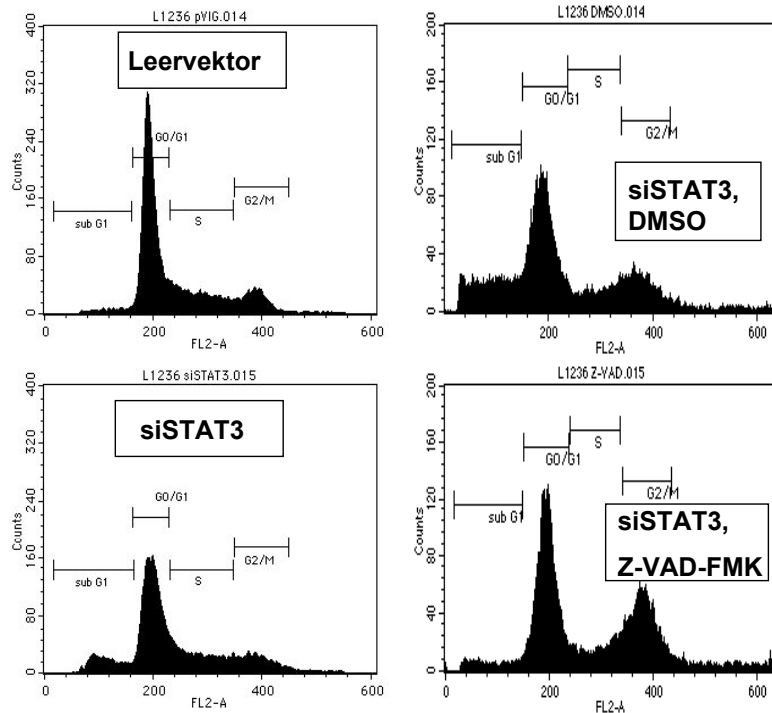
Gerät bestimmt. (A) 72 Stunden nach der Transduktion wurden 1000 Zellen pro Vertiefung in einer 96-Lochplatte ausgesät. Die Proliferation der transduzierten Zellen, angezeigt als metabolische Aktivität (Cell Titer Glo), wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen gemessen. Die Standardabweichung der Messpunkte ergab sich aus drei Einzelwerten. (B) 72 Stunden nach der Transduktion wurden untransduzierte, Leervektor-transduzierte und STAT3-siRNA-(siSTAT3) transduzierte L1236-Zellen mit dem DNA-Farbstoff BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) gefärbt. Nur replizierende Zellen bauen diesen Marker in ihre DNA ein und sind unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen.

Der Verlauf der Wachstumskurve zeigt deutlich, dass die Proliferation der STAT3-siRNA-(siSTAT3) exprimierenden L1236-Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen gleich bleibt. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurde zusätzlich eine BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin)-Färbung der transduzierten Zellen durchgeführt. Diese Methodik basiert auf dem Einbau von BrdU-Reagenz in die DNA von replizierenden Zellen. Nach Anregung unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheinen replizierende/proliferierende Zellen grün. Nicht-proliferierende oder tote Zellen sind nur im Durchlicht detektierbar (Abbildung 3.1.3.1-10, B). Die BrdU-Färbung bestätigte die Ergebnisse des Lumineszenz-basierten Proliferationstests. Untransduzierte- oder Kontrollvektor-transduzierte L1236-Zellen bauen den Farbstoff in ihre DNA ein und sind im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. In Abbildung 3.1.3.1-10, B ist ein repräsentativer Ausschnitt einer solchen Färbung dargestellt. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse eindeutig dass STAT3 eine essentielle Rolle für die Vitalität von L1236-Zellen spielt. Die BrdU-Färbung bestätigte außerdem, dass STAT3 wichtig für die Proliferation der L1236-Zellen ist. Beide Tests geben jedoch noch keinen eindeutigen Beweis, ob STAT3 auch für das Überleben dieser Zellen essentiell ist.

### **3.1.3.2 Einfluss der STAT3-siRNA auf den Zellzyklus von L1236-Zellen**

Um festzustellen ob STAT3 ein Überlebensfaktor für die L1236-Zellen darstellt, wurde ein Zellzyklusprofil von transduzierten Zellen erstellt (Abbildung 3.1.3.2-11). 48 Stunden nach der Transduktion wurden STAT3-siRNA- (siSTAT3) und Kontrollvektor-transduzierte L1236-Zellen fixiert und mit Propidiumjodid gefärbt.

## 48h nach Transduktion      72h nach Transduktion



L1236 Leervektor		L1236 DMSO	
Zellzyklusphasen		Zellzyklusphasen	
subG1	3%	subG1	21%
G0/G1	57%	G0/G1	44%
S	24%	S	12%
G2/M	14%	G2/M	16%
L1236 siSTAT3		L1236 Z-VAD-FMK	
Zellzyklusphasen		Zellzyklusphasen	
subG1	12%	subG1	5%
G0/G1	45%	G0/G1	43%
S	25%	S	12%
G2/M	14%	G2/M	12%

### Abbildung 3.1.3.2-11 Einfluss der STAT3-siRNA auf den Zellzyklus von L1236-Zellen

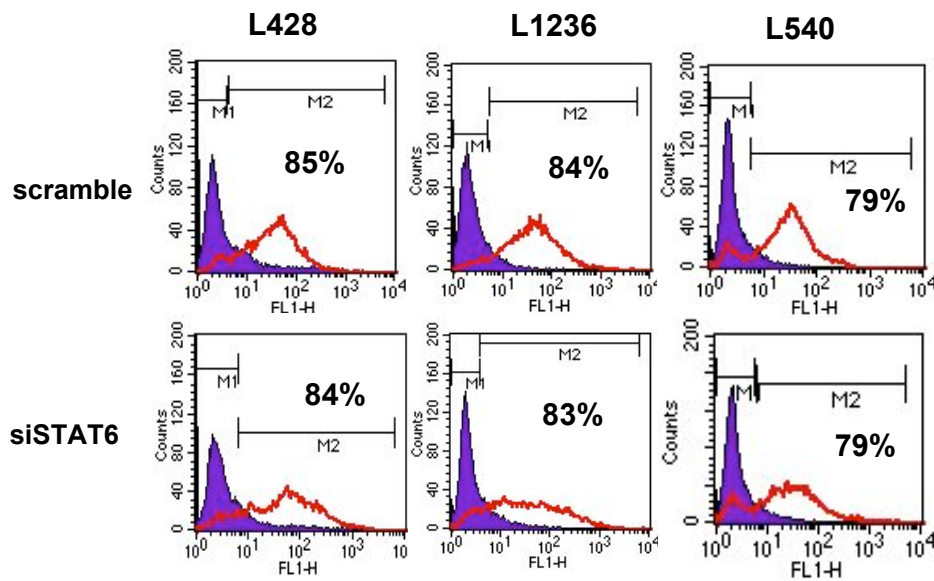
48 Stunden nach der Transduktion wurden Leervektor- und STAT3-siRNA- (siSTAT3) transduzierte L1236-Zellen fixiert und für eine Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid gefärbt. Diese Färbung ermöglicht die Detektion toter Zellen, dargestellt als subG1-Population, im FACS-Gerät. 72 Stunden nach der Transduktion wurden DMSO- und Z-VAD-FMK- behandelte L1236-Zellen für eine Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid gefärbt. Die Tabelle zeigt die prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus.

---

Der Anteil toter Zellen, gekennzeichnet durch fragmentierte DNA, ist in der subG1-Phase dargestellt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen ist die Anzahl toter Zellen in der STAT3-siRNA-exprimierenden Zellpopulation erhöht. Um zwischen Nekrose und Apoptose unterscheiden zu können, wurden STAT3-siRNA-transduzierte Zellen zusätzlich mit dem pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK inkubiert. 72 Stunden nach der Transduktion zeigte das Zellzyklusprofil deutlich, dass der pan-Caspase-Inhibitor die Anzahl toter Zellen reduzierte (Abbildung 3.1.3.2-11, rechte Seite). Somit ließ sich schlussfolgern, dass es sich bei den Zellen im subG1-Bereich des Profils um apoptotische Zellen handelt. STAT3 scheint in den L1236-Zellen sowohl die Proliferation der Zellen zu beeinflussen, als auch das Überleben der Zellen zu regulieren.

#### **3.1.4 Expression einer STAT6-siRNA in HL-Zelllinien**

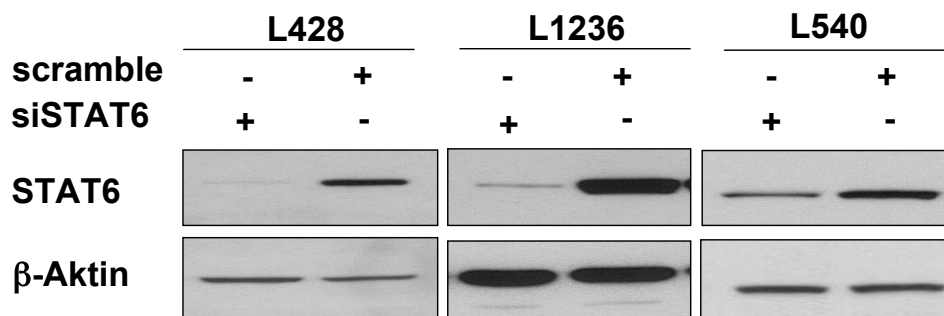
Mehrere Publikationen beschreiben eine konstitutive STAT6-Aktivität in verschiedenen HL-Zelllinien (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2002a). Diese Ergebnisse wurden in dieser Arbeit bestätigt (siehe Abbildung 3.1.1-3). Des Weiteren wurden in ca. 78% aller HL-Biopsien (Skinnider *et al.*, 2002b) konstitutiv aktives STAT6 nachgewiesen. Diese Daten deuten darauf hin, dass STAT6 eine wichtige Rolle bei der Transformation des klassischen Hodgkin-Lymphoms spielen könnte. Dennoch ist nicht bekannt, ob STAT6 das Wachstum oder sogar das Überleben von HL-Zelllinien beeinflusst. Um dies zu untersuchen wurde eine STAT6-siRNA abgeleitet und über die gleiche Klonierungsstrategie in den bereits zur Expression der STAT3-siRNA verwendeten Vektor pVIG kloniert (siehe Kapitel 2.1.11). Als Kontrolle wurde eine nicht-spezifische Sequenz (scramble) verwendet. Die STAT6-siRNA wurde in den L428-, L1236- und L540-Zellen exprimiert. In Abbildung 3.1.4-12 ist exemplarisch für weitere STAT6-siRNA-Experimente, die Transduktionseffizienz der verschiedenen HL-Zelllinien dargestellt.



#### Abbildung 3.1.4-12 Transduktionseffizienz der STAT6-siRNA in HL-Zelllinien

L428- und L1236-Zellen wurden mit einer MOI von 20, L540-Zellen mit einer MOI von 30 transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde mit Hilfe des FACS-Gerätes auf der Basis von GFP-Ko-Expression bestimmt. Die Abbildung zeigt exemplarische Transduktionseffizienzen für die verwendeten Zelllinien. Für weitere Experimente wurden nur Zellpopulationen verwendet, die mehr als 75% transduziert waren. Das violette Histogramm repräsentiert die GFP-negativen Kontrollzellen (M1). Das rote Histogramm kennzeichnet die GFP-positive Zellpopulation (M2). Die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozent ergibt aus der Anzahl der Zellen im M2-Profil.

Zur Kontrolle der STAT6-siRNA-Effizienz wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Immunfärbung mit einem STAT6-spezifischen Antikörper durchgeführt. In Abbildung 3.1.4-13 ist deutlich zu erkennen, dass die STAT6-siRNA die Expression von STAT6 in den L428- und L1236-Zellen nahezu vollständig unterdrückte. Die STAT6-Gesamtmenge in den L540-Zellen wurde nur leicht reduziert.

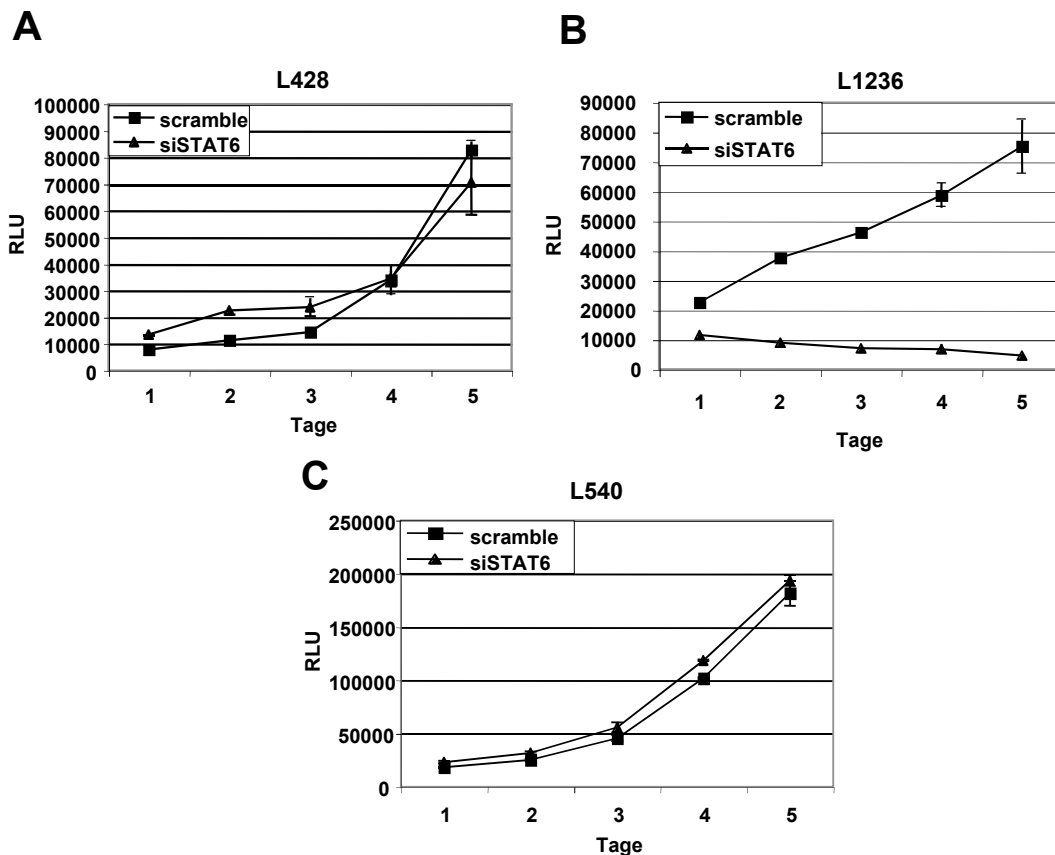


### Abbildung 3.1.4-13 Effekt der STAT6-siRNA auf die STAT6-Expression in HL-Zelllinien

L428-, L1236- und L540-Zellen wurden mit STAT6-siRNA-kodierenden Viren (siSTAT6) oder Kontrollviren (scramble) transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde mittels Ko-Expression von GFP im FACS-Gerät überprüft. 72 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen für einen RIPA-Extrakt geerntet. 30 µg des Extraktes wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die STAT6-Expression wurde mit einem STAT6-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet.

#### 3.1.4.1 Einfluss von STAT6-siRNA auf die Proliferation von HL-Zelllinien

Um festzustellen, ob STAT6 wichtig für die Proliferation von HL-Zelllinien ist, wurden Lumineszenz-basierte Proliferationstests (Cell Titer Glo, Promega) mit STAT6-siRNA-exprimierenden (siSTAT6) und Kontrollvirus- (scramble) exprimierenden L428-, L1236-, sowie L540-Zellen durchgeführt. Anhand der Wachstumskurven der transduzierten L428- (A), L1236- (B) und L540-Zellen (C) (Abbildung 3.1.4.1-14) erkennt man, dass die Hemmung von STAT6 nur in den L1236-Zellen (B) die Proliferation beeinflusste. Das Wachstum der STAT6-siRNA-exprimierenden L428- (A), sowie der L540-Zellen (C) blieb unverändert. Somit lässt sich an dieser Stelle schlussfolgern, dass STAT6 ein wichtiger Wachstumsfaktor für die L1236-Zellen ist, aber für das Wachstum der L428-Zellen keine Rolle spielt. Die Proliferationskurve der L540-Zellen blieb ebenfalls unbeeinflusst. Allerdings reduzierte die STAT6-siRNA die Gesamtmenge an STAT6 in diesen Zellen nicht so effizient, wie in den L428- und L1236-Zellen. Daher lässt sich nicht schlussfolgern, ob STAT6 für das Wachstum dieser Zellen wichtig ist.



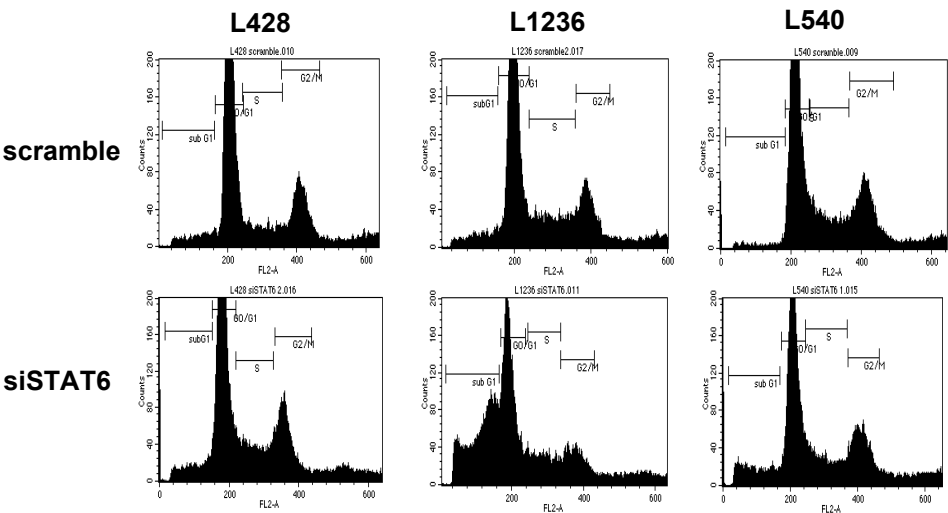
#### Abbildung 3.1.4.1-14 Einfluss der STAT6-siRNA auf die Proliferation von HL-Zelllinien

L428-, L1236- und L540-Zellen wurden mit STAT6-siRNA (siSTAT6) oder mit einem Kontrollvektor (scramble) transduziert. Die Transduktionseffizienz beider Vektoren wurde anhand der Ko-Expression von GFP im FACS überprüft. 72 Stunden nach der Transduktion wurden 1000 Zellen pro Vertiefung in einer 96-Lochplatte ausgesät. Die Proliferation der transduzierten Zellen, gemessen als metabolische Aktivität (Cell Titer Glo) wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen untersucht. Die Standardabweichung der einzelnen Messpunkte ergab sich aus drei Einzelwerten. Die Abbildung zeigt die Proliferationskurven für L428- (A), L1236- (B) und L540-Zellen (C).

#### 3.1.4.2 Einfluss der STAT6-siRNA auf den Zellzyklus von HL-Zelllinien

Anhand der Proliferationsdaten der L1236-Zellen ist nicht zu erkennen, ob die Zellen aufgrund eines Zellzyklusarrestes in ihrem Wachstum beeinflusst sind oder ob die Zellen sterben. Um dies zu untersuchen wurden STAT6-siRNA- (siSTAT6) und Kontrollvirus- (scramble) exprimierende L1236-Zellen 96 Stunden nach der Transduktion fixiert und mit dem DNA-Farbstoff Propidiumjodid angefärbt. Zusätzlich zu den L1236-Zellen wurde, als Beispiel für Zellen die nicht von STAT6 abhängig sind, ein Zellzyklusprofil von

transduzierten L428- und L540-Zellen aufgenommen. Die dabei entstandenen Profile zeigen eindeutig einen erhöhten Anteil an L1236- Zellen mit fragmentierter DNA, dargestellt als subG1-Population (Abbildung 3.4.2.-15). Der Anteil toter Zellen bei den Kontrollvirus- (scramble) transduzierten L1236-Zellen blieb unverändert. Des Weiteren waren kaum Veränderungen in den Zellzyklusprofilen von STAT6-siRNA-transduzierten L428-Zellen oder L540-Zellen zu erkennen (Abbildung 3.4.2-15).



L428 scramble		L428 siSTAT6	
Zellzyklusphasen		Zellzyklusphasen	
subG1	4%	subG1	6%
G0/G1	37%	G0/G1	43%
S	18%	S	14%
G2/M	16%	G2/M	15%

L1236 scramble		L1236 siSTAT6	
Zellzyklusphasen		Zellzyklusphasen	
subG1	5%	subG1	27%
G0/G1	42%	G0/G1	27%
S	23%	S	10%
G2/M	16%	G2/M	16%

L540 scramble		L540 siSTAT6	
Zellzyklusphasen		Zellzyklusphasen	
subG1	5%	subG1	9%
G0/G1	56%	G0/G1	55%
S	10%	S	10%
G2/M	17%	G2/M	14%

**Abbildung 3.1.4.2-15 Einfluss der STAT6-siRNA auf das Zellzyklusprofil von HL-Zelllinien**

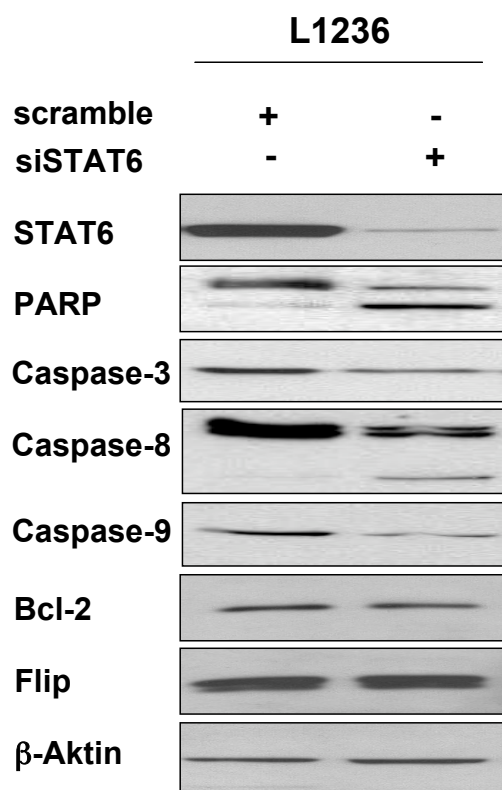
96 Stunden nach der Transduktion wurden STAT6-siRNA- (siSTAT6) und Kontrollvektor- (scramble) transduzierte L428-, L1236- und L540-Zellen fixiert und mit Propidiumjodid angefärbt. Ein entsprechendes Zellzyklusprofil wurde durch Messung im FL2-Kanal im FACS-Gerät aufgezeichnet. Eine prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus ist in der Tabelle dargestellt.



---

#### 3.1.4.3 Die STAT6-siRNA induziert Apoptose in den L1236-Zellen

Durch die Zellzyklusanalyse konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass STAT6 eine essentielle Rolle für das Überleben von L1236-Zellen spielt. Um dies zu bestätigen und zur genaueren Untersuchung des Mechanismus der STAT6-siRNA- vermittelten Induktion der Apoptose wurden Immunfärbungen von verschiedenen Apoptose-relevanten Proteinen durchgeführt. 60 µg RIPA-Extrakt von STAT6-siRNA- und Kontrollvirus-transduzierten L1236-Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Abbildung 3.1.4.3-16 zeigt zunächst, dass die STAT6-siRNA die Expression von STAT6 in L1236-Zellen nahezu vollständig unterdrückte. Ein molekularer Marker für die Induktion von Apoptose ist die Aktivierung von Effektor-Caspasen, sowie die Prozessierung von Caspase-Zielproteinen. Ein solches Zielprotein stellt beispielsweise PARP (poly-ADP-ribosyl polymerase) (Patel *et al.*, 1996; Reed, 2000) dar. In der Immunfärbung ist zu erkennen, dass die STAT6-siRNA die proteolytische Spaltung der Effektor-Caspasen 3, 8 und 9, sowie die Spaltung der nachgeschalteten PARP induziert (Abbildung 3.1.4.3-16). Apoptoseinduktion kann zusätzlich durch die reduzierte Expression der Gene von anti-apoptotischen Proteinen vermittelt sein. Dazu gehören z.B. c-Flip oder Bcl-2. In diesem Fall war allerdings keine Reduktion der c-Flip- oder Bcl-2-Expression zu beobachten (Abbildung 3.1.4.3-16). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Apoptose in den STAT6-siRNA-exprimierenden L1236-Zellen durch Caspasen vermittelt wurde.



#### Abbildung 3.1.4.3-16 Einfluss der STAT6-siRNA auf Apoptose-relevante Proteine in L1236-Zellen

96 Stunden nach der Transduktion wurden STAT6-siRNA- (siSTAT6) und Kontrollvirus- (scramble) transduzierte L1236-Zellen für einen RIPA-Extrakt geerntet. 60 µg Extrakt wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. In der Abbildung sind die Immunfärbungen mit spezifischen Antikörpern für Apoptose-relevante Proteine dargestellt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin nachgewiesen.

#### 3.1.4.4 Microarray-Analyse mit STAT6-siRNA-exprimierenden L1236-Zellen

Die Experimente mit der STAT6-siRNA in den L1236-Zellen deuten darauf hin, dass STAT6 möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms spielt. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von STAT6 Apoptose in HL-Zellen auslöst. Der genaue Mechanismus der Regulation ist allerdings noch unklar. Des Weiteren ist nicht bekannt wie die Expression und Aktivierung von STAT6 Apoptose in HL-Zellen verhindert. Um die Rolle von STAT6 bei der Inhibition der Apoptose in L1236-Zellen genauer zu untersuchen und STAT6-Zielgene zu identifizieren, die anti-apoptotisch wirken, wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt. Dazu wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann (Pathologie,

---

Universitätsklinikum Frankfurt/Main) der „Human Genome Survey Microarray V2.0“ der Firma Applied Biosystems verwendet. Auf diesem Chip der zweiten Generation sind 32.878 Proben gespottet, die 29.098 Gene repräsentieren. Um die größtmögliche Zuverlässigkeit der Daten zu gewährleisten, wurden je zwei biologische Duplikate von Kontrollvirus (scramble) sowie STAT6-siRNA- (siSTAT6) transduzierten L1236-Zellen auf je zwei Arrays hybridisiert. Bei den biologischen Duplikaten handelt es sich um unabhängige Transduktionen mit verschiedenen Viruspräparationen und damit auch um unabhängige RNA-Präparationen. Um eine hohe Reproduzierbarkeit der Einzeldaten zu gewährleisten wurden die einzelnen Schritte der Experimente an verschiedenen Stellen überprüft. Zuerst wurde die Transduktionseffizienz für beide Einzelexperimente im FACS-Gerät mittels Ko-Expression von GFP überprüft. Nach erfolgreicher Transduktion wurde die Effizienz der STAT6-siRNA, die STAT6-Expression zu hemmen, für beide Transduktionsansätze im Western Blot untersucht. Zum gleichen Zeitpunkt zu dem die Zellen für die Immunfärbung geerntet wurden, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt um die Menge an Zellen mit fragmentierter DNA (subG1-Phase) zu bestimmen. Der Anteil apoptotischer Zellen lag zwischen 20-24%. Zum gleichen Zeitpunkt zu dem die Zellen für die Immunfärbung geerntet wurden und für die Zellzyklusanalyse fixiert wurde, wurde auch die RNA für die Microarray-Analyse präpariert. Der Zeitpunkt wurde so gewählt damit Gene die eine Hemmung der Apoptose vermitteln, besser identifiziert werden können. Diese Apoptose-Regulatoren sollten zu diesem Zeitpunkt effizient herunterreguliert sein. Für die Microarray-Analyse wurden 5 µg Gesamt-RNA entsprechend den Herstellerangaben (Applied Biosystems) aufgearbeitet und markiert (siehe Kapitel 2.2.3.21). Anschließend wurden die Proben auf die entsprechenden Chips hybridisiert und prozessiert. Diese Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann, Universitätsklinikum Frankfurt, ausgeführt. Für die Auswertung wurden die Genexpressionsmuster der beiden biologischen Duplikate (scramble und scramble, sowie STAT6-siRNA und STAT6-siRNA) miteinander verglichen.

In die folgende Tabelle (Tabelle 3.1.4.4-2) gingen nur solche Gene ein, die jeweils in beiden Duplikaten einen „Fold change“ von mehr als 2 aufwiesen.

Gen	Fold Change	Bedeutung
<b>Apoptose</b>		
Bal (PARP)	-4	Caspase-Zielgen
Tec	-2,7	Tyrosinkinase
Caspase7	-2,6	Proteolyse
Flip (CFLAR)	-2	Proteolyse
TNFSF10 (TRAIL)	-8	NFkappaB-Signalweg
HSXIAPAF1 (XAF1)	-2,1	XIAP-assoziiert
ENDO G	2,3	Endonuklease
<b>Chemotaxis</b>		
CCL7	-7,7	Chemokin Ligand
<b>IFN-Induziert</b>		
Gpr15	-10	G-Protein gekoppelt
G1p2	-6,2	Proteolyse
Gbp1	-17	Guanylat-Bindeprotein
Gbp4	-6,8	Guanylat-Bindeprotein
Trim22 (Staf50)	-17	Proteolyse
Trim5	-3,9	Tripartit-Motif-enthaltendes Protein
Trim34	-8,1	Tripartit-Motif-enthaltendes Protein
IFI16	-7	IFN-induzierbares Protein 16
IFIT4	-8,1	IFN-Immunität
IFNB1	-12	IFN-Immunität
STAT1	-8,4	Transkriptionsfaktor
MX1	-6,9	IFN-Immunität
OAS	-14	IFN-Immunität
AIM2	-8,6	Tumorsuppressor
<b>STAT6+Zielgene</b>		
STAT6	3,2	Transkriptionsfaktor
IL13RA1	2,7	IL-13 Rezeptoruntereinheit
Alox15	2,8	Arachidonsäurelipoxygenase
<b>Zellzyklus</b>		
CDKN1A (p21)	-2,8	CDK-Inhibitor, Zellzyklusregulator
Spec	-2,3	Proteineffektor von Cdc42
Cdc14	-3,1	Phosphatase
Cdk6	3,4	Cyclin abhängige Kinase
Cdkn2C	2,6	Tumorsuppressor
<b>Angiogenese</b>		
Pla2g4c	-4,8	Phospholipase
Ager	-3,4	Acetyltransferase
Lpxn	-5,2	Leupaxin, VEGF-Signalweg
Ephb1	3	Ephrin-Rezeptor
Cdh1 (e-cadherin)	-3,8	Zellkontakt

Methyltransferasen		
Hrmt126 (PRMT16)	2,1	Arginin-Methyltransferase
Tyms	2,2	Methyltransferase
Dnmt3A	-2,9	CpG-Methylierung
andere Transkriptionsfaktoren		
Myb	2,1	Onkogen
Myc	2,4	Onkogen
Mmp15	2,2	Proteolyse
Adamts16	-2,8	Proteolyse
Adamts1	-2,7	Proteolyse
Rrp22	2,1	Ras-ähnlich
Rab9a	-2,3	Ras-ähnlich
MLLT1	-2	Onkogen
MLLT3	-2,5	Onkogen
MLL4	-2	Onkogen
Ptpnc	-3,4	Tyrosin-Phosphatase
SOCS5	-2,8	JAK/STAT-Kaskade
FAT	-3,7	Proliferation
Usp6	3,4	Proteolyse
Usp25	-2,5	Proteolyse
LAK	-4	Lymphozyten-Kinase
Siglec9	-2	Bindeprotein
Smurf2	-2,4	E3-Ligase
Ipo4	2,1	Importin 4
Tiam2	-3,7	NFkappaB-Signalweg

#### Tabelle 3.1.4.4-2 Microarray-Analyse

Die Tabelle gibt einen Überblick über unterschiedlich regulierte Gene in STAT6-siRNA- und Kontrollvektor- (scramble) transduzierten L1236- Zellen. In die Liste gingen nur solche Gene ein, die bei beiden Duplikaten einen „Fold-Change“ von mehr als zwei aufwiesen. Die Gene wurden mit Hilfe einer Klassifizierungssoftware von Applied Biosystems (Panther™) einer biologischen Funktion zugeordnet. Gene, die hochreguliert waren, sind als negative „Fold-Changes“ dargestellt. Gene, die herunterreguliert waren, sind als positive „Fold-Changes“ dargestellt.

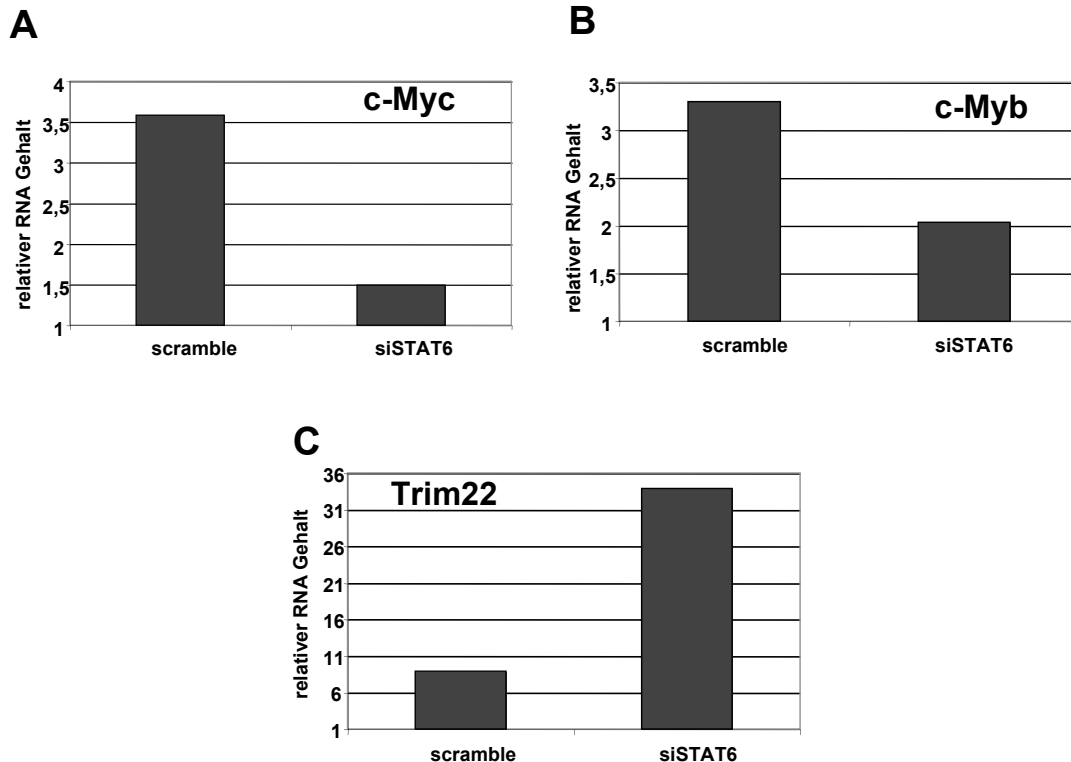
Insgesamt waren 653 Gene differentiell reguliert. Tabelle 3.1.4.4-2 zeigt einen Ausschnitt dieser unterschiedlich regulierten Gene. Die Gene ließen sich aufgrund ihrer biologischen Funktion verschiedenen Prozessen zuordnen. Wie anhand der bisherigen Daten erwartet, sind Gene vertreten, die in die Regulation der Apoptose und des Zellzyklus eingreifen, aber auch solche, die mit Chemotaxis und Angiogenese assoziiert werden. Am stärksten induziert waren Gene, die eine Interferon-induzierte Immunantwort (OAS1, Trim22, STAT1) vermitteln (Gongora *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2005; Bromberg *et al.*, 1996). Dies deutet zunächst auf eine Aktivierung klassischer antiviraler Signalmoleküle aufgrund der Transduktion selbst hin. Diese Gene wurden aber durch die Kontrollviren (scramble) nicht aktiviert. Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass Trim22 eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Leukämien spielt (Obad *et al.*, 2004). Des Weiteren

---

bestätigte der Microarray eine Hemmung von STAT6 auf RNA-Ebene, sowie eine Hemmung von Genen, die über STAT6 reguliert werden (ALOX15, IL-13RAalpha) (Conrad *et al.*, 2000; Shankaranarayanan *et al.*, 2001; Yasunaga *et al.*, 2003). Darüber hinaus zeigte sich, dass die STAT6-siRNA zwei klassische Onkogene (c-Myb, c-Myc) (Greco *et al.*, 2001; Gewirtz, 1996; Zhu *et al.*, 2005; Refaeli *et al.*, 2005) herunterregulierte. Vertreter der Matrixmetalloproteasen (Adamts16, Adamts11), die an Proteolysevorgängen beteiligt sind, wurden induziert (Tang, 2001; White, 2003).

#### **3.1.4.5 Validierung von potentiellen STAT6-Zielgenen in L1236-Zellen**

Zur Bestätigung der Microarray-Daten wurde der Einfluss von STAT6 auf die beiden Onkogene c-Myc und c-Myb, sowie auf Trim22 mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (iCycler) untersucht. Zu diesem Zweck wurde RNA aus STAT6-siRNA- (siSTAT6) und Kontrollvirus- (scramble) transduzierten L1236-Zellen präpariert. Alle Werte wurden gegen 18S-RNA normalisiert und aus drei Einzelwerten gemittelt. Eine effiziente Hemmung der STAT6-Expression wurde zuvor im Western Blot getestet. Eine Hemmung der beiden Onkogene c-Myc und c-Myb auf RNA-Ebene konnte bestätigt werden (Abbildung 3.1.4.5-17, A und B). Im Vergleich zu den Kontrollvirus- (scramble) transduzierten L1236-Zellen, hemmte die STAT6-siRNA die Expression von c-Myc und c-Myb vergleichbar. Der relative RNA-Gehalt von c-Myc wurde durch die STAT6-siRNA von 3,5 auf 1,5 reduziert (Abbildung 3.1.4.5-17, A). Der relative RNA-Gehalt von c-Myb wurde durch die STAT6-siRNA von 3,3 auf 2,1 verringert (Abbildung 3.1.4.5-17, B). Des Weiteren bestätigte die quantitative RT-PCR eine signifikante Induktion von Trim22 (Abbildung 3.1.4.5-17, C). Der relative RNA-Gehalt von Trim22 wurde durch die STAT6-siRNA von 7 auf 32 erhöht (Abbildung 3.1.4.5-17, C). Inwieweit die einzelnen Gene direkt oder indirekt durch STAT6 reguliert werden, bedarf genauerer Untersuchungen. Ebenso inwieweit c-Myc, c-Myb und Trim22 an der Regulation der Proliferation und Induktion von Apoptose von L1236-Zellen beteiligt sind.



#### Abbildung 3.1.4.5-17 Validierung von potentiellen STAT6-Zielgenen

Mit Hilfe der RT-PCR wurde der relative RNA-Gehalt von c-Myc (A), c-Myb (B) und Trim22 (C) in den L1236-Zellen bestimmt. Alle Werte wurden gegen 18S-RNA normalisiert und aus drei Einzelwerten gemittelt. Die Darstellung ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

## 3.2 Die Bedeutung von SOCS1 und SOCS3 im klassischen Hodgkin-Lymphom

### 3.2.1 Die Expression von SOCS1 und SOCS3 in HL-Zelllinien

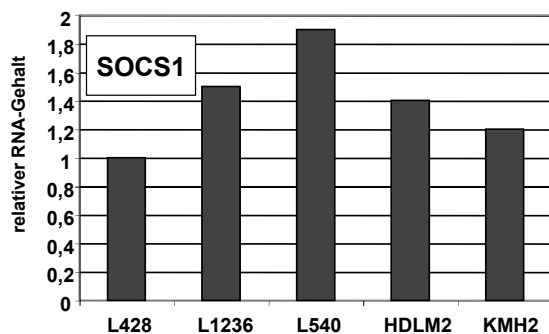
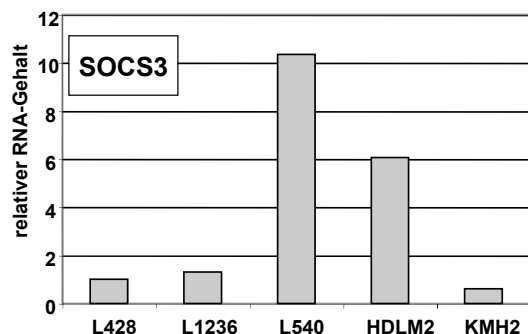
Eine andere Möglichkeit die Bedeutung des JAK/STAT-Signalweges für die Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms zu untersuchen, bieten Negativregulatoren dieser Signalkaskade. Zu diesen Negativregulatoren gehören die SOCS (suppressor of cytokine signaling)-Proteine. Als direkte Zielgene der STATs regulieren sie die Aktivität der Signaltransduktionskaskade in einem negativen Rückkopplungsmechanismus (negative feedback) (Starr *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass die STAT-Proteine konstitutiv

---

aktiviert vorliegen deutet die Möglichkeit an, dass die Negativregulation des Signalweges durch die SOCS-Proteine gestört ist.

Die einzelnen SOCS-Familienmitglieder unterscheiden sich in ihrem Wirkungsmechanismus. Im Gegensatz zu einer siRNA, die gezielt nur ein Transkript abbaut, greifen SOCS1 und SOCS3 auf der Ebene der STAT-aktivierenden Kinasen in die Signalkaskade ein und können somit verschiedene STAT-Mitglieder, aber auch noch andere Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Um zu untersuchen, inwieweit SOCS1 und SOCS3 die JAK/STAT-Signalkaskade beeinflussen, wurde zunächst die endogene Menge an SOCS1 und SOCS3 in fünf HL-Zelllinien mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Alle Werte wurden gegen 18S-RNA normalisiert und sind in Abbildung 3.2.1-18 als relativer RNA-Gehalt dargestellt. Zwischen den einzelnen HL-Zelllinien sind deutliche Unterschiede erkennbar. Die L428-Zellen exprimierten am wenigsten SOCS1 (A), sowie SOCS3 (B) und wurden daher als Referenzwert verwendet (1). Die größte Menge an SOCS1 und SOCS3 wurde in den L540-Zellen detektiert. In dieser Zelllinie wurden auch die meisten aktivierten STAT-Proteine gefunden. Die HDLM2-Zellen exprimierten mehr SOCS3 als die L1236-Zellen, aber ungefähr gleich viel SOCS1. Allerdings wurde auch in den KMH2-Zellen SOCS1 und SOCS3 exprimiert, obwohl diese Zellen keine aktivierten STATs besitzen. Das heißt die SOCS-Proteine werden in dieser Zelllinie durch andere Transkriptionsfaktoren aktiviert. Insgesamt wurde in allen Zelllinien weniger SOCS1 als SOCS3 exprimiert. Dabei stellt sich die Frage, ob Zellen die eine hohe STAT-Aktivität und zugleich eine hohe SOCS1- und SOCS3-Expression aufweisen nicht mehr sensitiv für die Regulation durch die SOCS-Proteine sind oder ob die STAT-Proteine durch Kinasen aktiviert werden, die unzugänglich sind für eine SOCS-vermittelte Negativregulation.



**A****B**

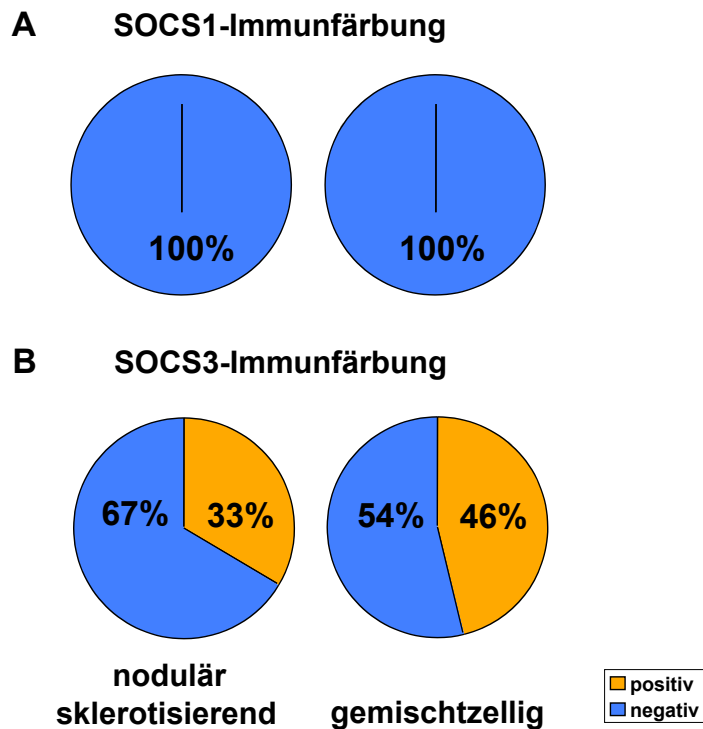
### Abbildung 3.2.1-18 Endogener SOCS1- und SOCS3–RNA-Gehalt in HL-Zelllinien

Mit Hilfe der RT-PCR wurde der relative RNA-Gehalt von SOCS1 (A) und SOCS3 (B) in den HL-Zelllinien bestimmt. Alle Werte wurden gegen 18S-RNA normalisiert und aus drei Einzelwerten gemittelt. Die Darstellung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

### 3.2.2 Die Expression von SOCS1 und SOCS3 in HL-Biopsien

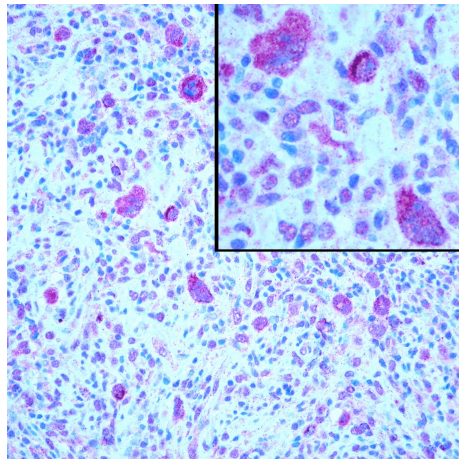
Um die Bedeutung von SOCS1 und SOCS3 detaillierter zu untersuchen, wurden in Parafin eingebettete HL-Biopsien auf SOCS1- und SOCS3-Expression untersucht. Diese immunhistochemischen Färbungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann, Universitätsklinikum Frankfurt durchgeführt und von Pathologen ausgewertet. Insgesamt wurden 40 HL-Biopsien mit einem SOCS1–Antikörper gefärbt. In keinem Fall konnte eine Expression von SOCS1 nachgewiesen werden obwohl Kontrollfärbungen positiv waren (Abbildung 3.2.2-19). Für die SOCS3-Färbungen wurden 117 HL-Biopsien verwendet, von denen 59 zur Unterklasse des nodulär sklerotisierenden Hodgkin-Lymphoms zählen und 58 als gemischtzellig klassifiziert wurden. Ein Beispiel für eine immunhistochemische Färbung mit einem SOCS3-Antikörper ist in Abbildung 3.2.2-20 dargestellt. Die SOCS3-Expression ist erkennbar an der rötlichen Färbung und ist hauptsächlich im Zytoplasma von mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen lokalisiert. Abbildung 3.2.2-19 zeigt eine prozentuale Verteilung des immunhistochemischen Nachweises von SOCS1 und SOCS3 in HL-Biopsien. Bei den SOCS3-Färbungen sind deutliche Unterschiede zu erkennen. In 33% der HL-Biopsien der nodulär sklerotisierenden Unterklasse

konnte eine Expression von SOCS3 nachgewiesen werden. Bei den HL-Biopsien, die als gemischtzellig eingestuft wurden, konnte eine Expression von SOCS3 in 46% der Fälle nachgewiesen werden. Zusätzliche Färbungen der gleichen HL-Biopsien mit einem Phospho-STAT3- bzw. einem Phospho-STAT6-Antikörper zeigten, dass in einigen Biopsien konstitutiv aktiviertes STAT3 bzw. STAT6 vorliegt (Daten nicht gezeigt). In HL-Biopsien, in denen konstitutiv aktive STATs und SOCS3 vorliegt, scheint die Negativregulation durch die SOCS-Proteine nicht mehr zu funktionieren oder die STATs werden durch SOCS-insensitive Kinasen aktiviert.



#### **Abbildung 3.2.2-19 Expression von SOCS1 und SOCS3 in HL-Biopsien**

Dargestellt ist eine prozentuale Verteilung der SOCS1- und SOCS3-Expression in HL-Biopsien. Insgesamt wurden 40 Proben mit einem SOCS1-Antikörper gefärbt. 117 Proben wurden mit einem SOCS3-Antikörper gefärbt. Die einzelnen HL-Biopsien wurden als nodulär sklerotisierend (59 Fälle) oder gemischtzellig (58 Fälle) klassifiziert. In (A) sind die Immunfärbungen mit dem SOCS1-Antikörper, in (B) die Immunfärbungen mit dem SOCS3-Antikörper dargestellt. Der Anteil an HL-Biopsien die SOCS1 oder SOCS3 nicht exprimierten, ist blau dargestellt, der Anteil der HL-Biopsien die SOCS1 oder SOCS3 exprimierten ist orange dargestellt.



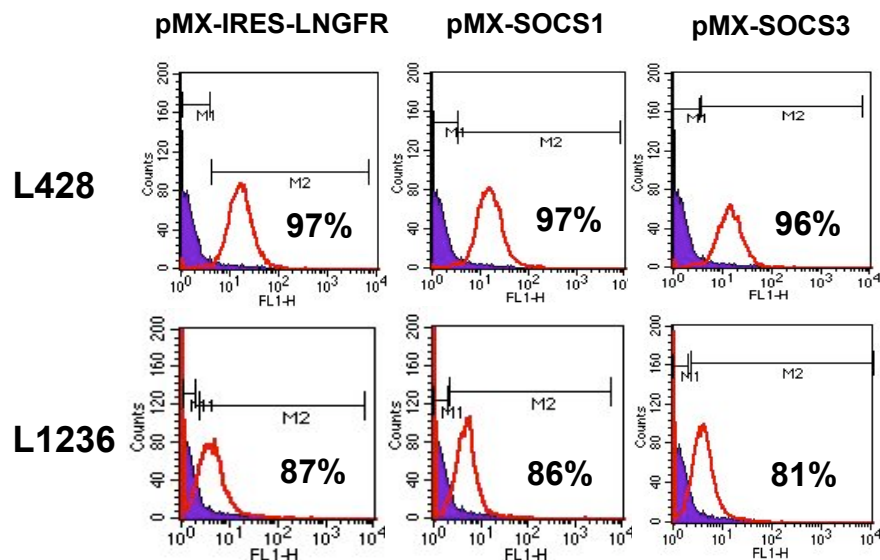
**Abbildung 3.2.2-20 Immunhistochemische Färbung einer HL-Biopsie mit einem SOCS3-Antikörper**

Parafin-eingebettete HL-Biopsien wurden mit einem SOCS3-Antikörper gefärbt. Die Expression von SOCS3 im Gewebe ist durch die rötliche Färbung erkennbar und ist hauptsächlich von mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen lokalisiert. Insgesamt wurden 117 HL-Biopsien mit dem SOCS3-Antikörper gefärbt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel einer solchen Färbung.

**3.2.3 Einfluss von überexprimiertem SOCS1 und SOCS3 auf die STAT3-Aktivierung in HL-Zelllinien**

Um die Sensitivität der JAK/STAT-Signalkaskade bezüglich einer Negativregulation durch SOCS1 und SOCS3 in verschiedenen HL-Zelllinien zu testen, wurden die cDNAs von SOCS1 und SOCS3 in einen retroviralen Vektor (pMX) kloniert (siehe Kapitel 2.1.12) und in HL-Zelllinien exprimiert. Die HL-Zelllinien wurden mit einer MOI von 20 (L428, L1236) transduziert. Die L540-, HDLM2- und KMH2-Zellen erwiesen sich aufgrund ihres langsamen Wachstums als ungeeignet für eine retrovirale Transduktion, da Retroviren nur sich teilende Zellen infizieren. Die Transduktionseffizienz wurde anhand eines LNGFR (low affinity nerve growth factor receptor)-Markers im FACS-Gerät bestimmt.

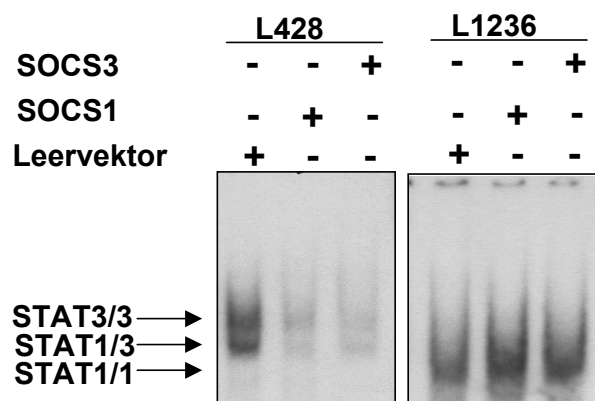
Als Kontrolle wurde der leere Vektor pMX-IRES-LNGFR benutzt. Abbildung 3.2.3-21 zeigt exemplarisch die retrovirale Transduktionseffizienz in den L428- und L1236- Zellen.



**Abbildung 3.2.3-21 Transduktionseffizienz mit Retroviren, die für SOCS1 und SOCS3 kodieren in L428- und L1236-Zellen**

L428- und L1236-Zellen wurden mit einer MOI von 20 transduziert. Als Kontrolle für die SOCS1- (pMX-SOCS1) und SOCS3- (pMX-SOCS3) Konstrukte wurde der Leervektor (pMX-IRES-LNGFR) benutzt. Zum Nachweis der Transduktionseffizienz wurde der LNGFR-Marker im FACS-Gerät nach Färbung mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Abbildung zeigt für jede Zelllinie ein Beispiel einer solchen Transduktion. Für alle weiteren Experimente wurden nur solche Zellen verwendet, die mehr als 75% transduziert waren. Das violette Histogramm repräsentiert die LNGFR-negativen Kontrollzellen (M1). Das rote Histogramm kennzeichnet die LNGFR-positive Zellpopulation (M2). Die Anzahl der LNGFR-positiven Zellen in Prozent ergibt aus der Anzahl der Zellen im M2-Profil.

Um zunächst den Effekt von SOCS1 und SOCS3 auf die Aktivierung von STAT3 zu untersuchen, wurden Gelretardierungsexperimente mit einem STAT1/STAT3-spezifischen radioaktiv-markierten DNA-Bindungselement (hSIE) durchgeführt. Abbildung 3.2.3-22 zeigt, dass sowohl SOCS1, als auch SOCS3 die STAT3/DNA-Bindung in L428-Zellen sehr effizient hemmte. Die DNA-Bindung in den L1236-Zellen wurde weder durch SOCS1, noch durch SOCS3 beeinflusst.

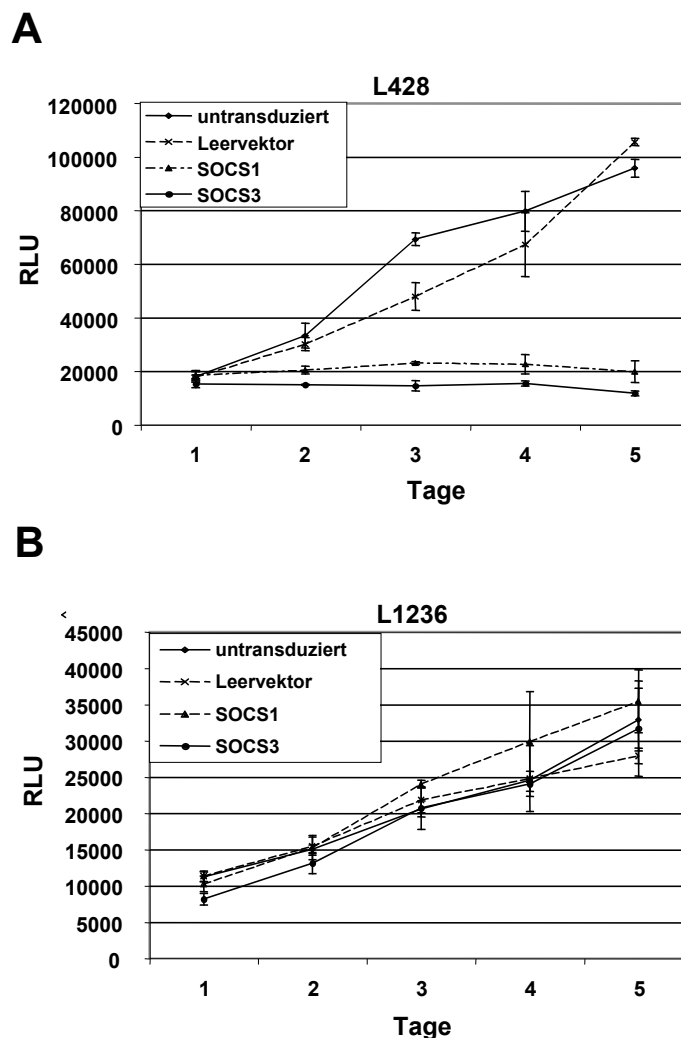


### 3.2.3-22 Einfluss von SOCS1 und SOCS3 auf die STAT1- und STAT3/DNA-Bindung in L428- und L1236-Zellen

In L428- und L1236-Zellen wurden über ein retrovirales Expressionssystem SOCS1 und SOCS3 überexprimiert. Als Kontrolle wurde der Leervektor verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde anhand der Ko-Expression von LNGFR im FACS-Gerät überprüft. 72 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen für Gesamtzellextrakte geerntet. 8 µg Extrakt wurden mit einem radioaktiv markierten STAT1/STAT3-DNA-Bindungselement (hSIE) inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Komplexzusammensetzung in den L428- und L1236-Zellen ist mit Pfeilen angezeigt.

### 3.2.4 Einfluss von überexprimiertem SOCS1 und SOCS3 auf die Proliferation von HL-Zelllinien

In einem Lumineszenz-basierten Proliferationstest (Cell Titer Glo, Promega) wurden die Effekte der SOCS1- und SOCS3-Überexpression in L428- Zellen und L1236-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 3.2.4-23 zu erkennen ist, sind SOCS1- und SOCS3-exprimierende L428-Zellen (A) in ihrem Wachstum gehemmt. Das Wachstum der L1236-Zellen (B) wurde durch SOCS1 und SOCS3 nicht beeinflusst. Ein Unterschied zwischen SOCS1 und SOCS3 war nicht erkennbar.



**Abbildung 3.2.4-23 Einfluss von SOCS1 und SOCS3 auf die Proliferation von L428- und L1236-Zellen**

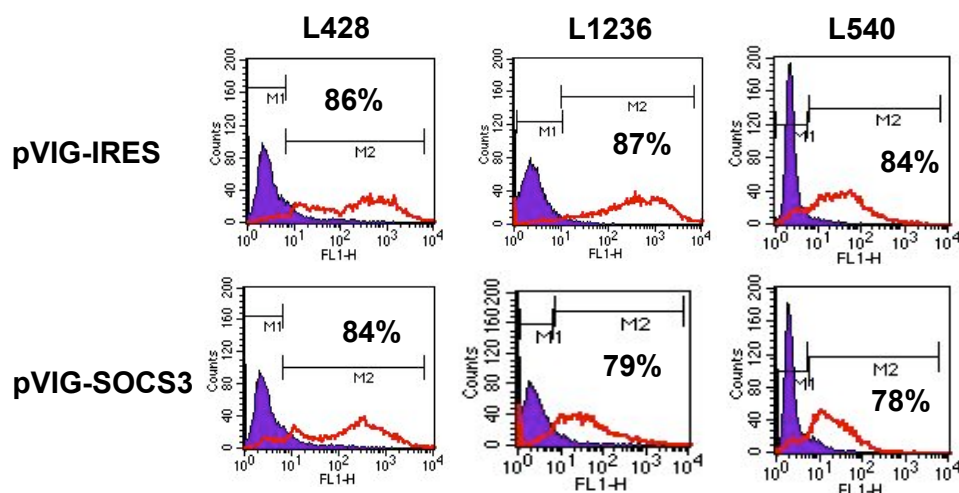
L428- und L1236-Zellen wurden mit SOCS1, SOCS3 und als Kontrolle mit dem Leervektor retroviral transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde anhand der Ko-Expression von LNGFR im FACS-Gerät überprüft. 72 Stunden nach der Transduktion wurden 1000 Zellen pro

Vertiefung in einer 96-Lochplatte ausgesät. Die Proliferation der Zellen wurde in einem Lumineszenz-basierten System auf der Basis von ATP-Umsatz für den Zeitraum von 5 Tagen gemessen. Alle Einzelwerte wurden als Triplikate erfasst und sind in der Standardabweichung zusammengefasst. In (A) sind die Wachstumskurven der transduzierten L428-Zellen, in (B) die Wachstumskurven der L1236-Zellen dargestellt.

### 3.2.5 Expression von SOCS3 in einem lentiviralen System

Um die Überexpression von SOCS3 auch in den L540-Zellen zu ermöglichen, wurde die SOCS3-cDNA in den lentiviralen Vektor pVIG-IRES umkloniert.

Im Gegensatz zu dem bisher verwendeten retroviralen Vektor pMX, enthält der pVIG-IRES-Vektor statt eines LNGFR-Markergens einen GFP-Marker. Dieser kann ohne vorangehende Antikörperfärbungen im FACS-Gerät nachgewiesen werden. Des Weiteren stehen Transkripte im lentiviralen Vektor pVIG-IRES unter der Kontrolle eines SFFV-Promotors (spleen focus forming virus). Dieser Promotor ist für die Expression in hämatopoetischen Zellen, sowie insbesondere für B-Zellen optimiert (Werner *et al.*, 2004). Ein weiterer Vorteil des Vektorsystems besteht darin, dass Lentiviren nicht nur sich teilende Zellen, wie im Falle von Retroviren, sondern auch nicht-replizierende Zellen infizieren können. Somit können auch langsamer wachsende Zellen transduziert werden. Exemplarische Transduktionseffizienzen sind in Abbildung 3.2.5-24 dargestellt.

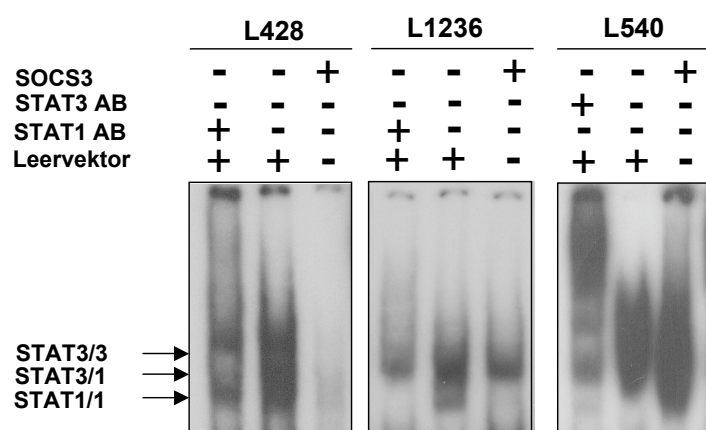


#### Abbildung 3.2.5-24 Transduktionseffizienzen von SOCS3 in HL-Zelllinien

L428- und L1236-Zellen wurden mit einer MOI von 20, die L540-Zellen mit einer MOI von 30 transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde mit Hilfe des FACS-Gerätes, basierend auf der Ko-Expression von GFP bestimmt. Als Kontrolle für die SOCS3-Expression (pVIG-SOCS3) wurde der Leervektor pVIG-IRES verwendet. Die Abbildung zeigt für jede Zelllinie ein Beispiel einer solchen Transduktion. Für alle weiteren Experimente wurden nur solche Zellen verwendet,

die mehr als 75% transduziert waren. Das violette Histogramm repräsentiert die GFP-negativen Kontrollzellen (M1). Das rote Histogramm kennzeichnet die GFP-positive Zellpopulation (M2). Die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozent ergibt aus der Anzahl der Zellen im M2-Profil.

Als Kontrolle wurde der leere Vektor (pVIG-IRES) verwendet. Um die Ergebnisse von überexprimiertem SOCS3 aus den retroviren Versuchen zunächst zu bestätigen wurden Gelretardierungsexperimente mit einem radioaktiv markierten STAT1/STAT3-DNA-Bindeelement (hSIE) durchgeführt. Abbildung 3.2.5-25 bestätigte die Ergebnisse aus den retroviralen SOCS3-Experimenten für die L428-Zellen. Im Gegensatz zu den retroviralen Experimenten mit SOCS3 (Abbildung 3.2.3-22), war nach SOCS3-Überexpression im lentiviralen System eine deutliche Hemmung der DNA-Bindung von STAT1/1-Homodimeren in L1236-Zellen zu erkennen. Diese abweichenden Ergebnisse sind wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Effizienz der beiden Expressionssysteme zurückzuführen. Das lentivirale Expressionssystem ermöglichte nun auch die effiziente Überexpression von SOCS3 in L540-Zellen. Diese wurden mit einer MOI von 30 transduziert. Abbildung 3.2.5-25 zeigte jedoch, dass die Überexpression von SOCS3 keinen Einfluss auf die STAT3/DNA-Bindung in L540-Zellen hatte, sondern eher die Bindung von STAT1 an das hSIE-Element verstärkte.



#### Abbildung 3.2.5-25 Einfluss von SOCS3 auf die STAT1- und STAT3/DNA-Bindung in HL-Zelllinien

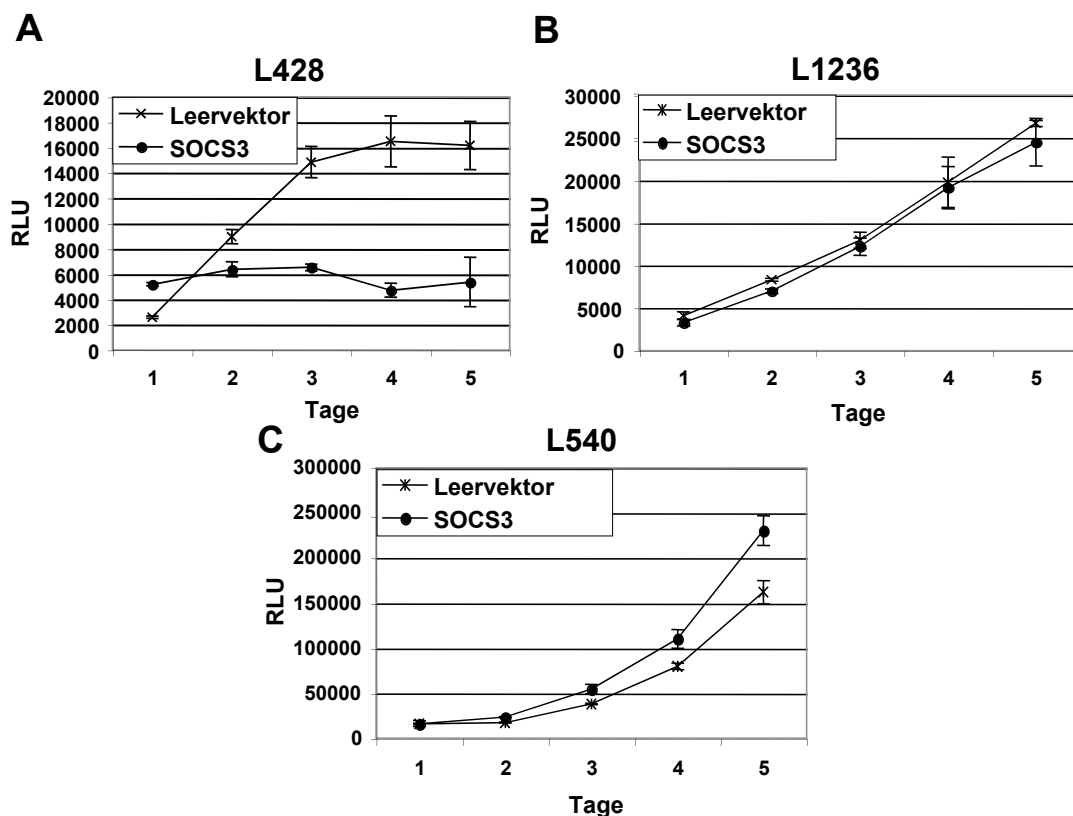
SOCS3 (pVIG-SOCS3) wurde in den L428-, L1236- und L540-Zellen über ein lentivirales Expressionssystem überexprimiert. Als Kontrolle wurde der Leervektor (pVIG-IRES) verwendet. 72 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen für Gesamtzellextrakte (WCE) geerntet. 8 µg Extrakt wurden mit einem radioaktiv markierten STAT1/STAT3-DNA-Bindeelement (hSIE)



inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Komplexzusammensetzung wurde durch Zugabe spezifischer Antikörper (AB) bestimmt. Die unterschiedlichen Dimere sind durch Pfeile gekennzeichnet.

### 3.2.6 Einfluss von überexprimiertem SOCS3 auf die Proliferation von HL-Zelllinien

Der Einfluss von überexprimiertem SOCS3 auf die Proliferation von HL-Zelllinien wurde getestet, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben. Die Proliferationsdaten, die bereits mit dem retroviralen SOCS3-Expressionssystem für die L428- und L1236-Zellen gemessen wurden (Abbildung 3.2.4-23), konnten für das lentivirale SOCS3-Expressionssystem bestätigt werden (Abbildung 3.2.6-26, A und B).



**Abbildung 3.2.6-26 Einfluss von SOCS3 (lentiviral) auf die Proliferation von HL-Zelllinien**

L428- und L1236-Zellen wurden mit einer MOI von 20, L540-Zellen mit einer MOI von 30 transduziert. Als Kontrolle wurde der Leervektor verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde anhand der Ko-Expression von GFP im FACS-Gerät überprüft. 72 Stunden nach der Transduktion wurden 1000 Zellen pro Vertiefung in einer 96-Lochplatte ausgesät. Die

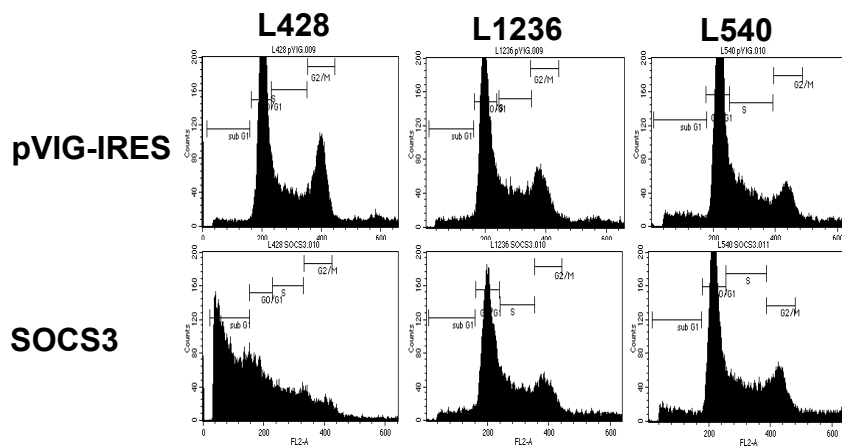
---

Proliferation der Zellen wurde mit einem Lumineszenz-basierten System auf der Basis von ATP-Umsatz für den Zeitraum von 5 Tagen gemessen. Alle Einzelwerte wurden als Triplikate erfasst und sind in der Standardabweichung zusammengefasst.

Da SOCS3 in den L1236-Zellen die Aktivierung von STAT1 hemmte, deutet diese Beobachtung darauf hin, dass STAT1 in den L1236-Zellen keine Rolle bei der Regulation der Wachstums und des Überlebens spielt. Zusätzlich wurde das Wachstum von SOCS3-transduzierten L540-Zellen bestimmt. Allerdings war in diesem Fall kein Effekt von SOCS3 auf die Proliferation von L540-Zellen zu beobachten (Abbildung 3.2.6-26, C).

### **3.2.7 Einfluss von SOCS3 auf den Zellzyklus von HL-Zelllinien**

Da die Daten des Lumineszenz-basierten Vitalitätstests keinen Aufschluss geben, ob die L428-Zellen nach SOCS3-Überexpression in ihrem Wachstum aufgrund eines Zellzyklusarrestes arretiert sind oder in Apoptose gehen, wurde ein Zellzyklusprofil aufgenommen. Zu diesem Zweck wurden Leervektor- (pVIG-IRES) und SOCS3-transduzierte Zellen 96 Stunden nach der Transduktion fixiert und mit Propidiumjodid angefärbt. Abbildung 3.2.7-27 zeigt einen deutlich erhöhten Anteil von L428-Zellen mit fragmentierter DNA (subG1-Phase) nach Expression von SOCS3. Somit führt eine Überexpression von SOCS3 nur in den L428-Zellen zur Induktion von Zelltod. Die Zellzyklusprofile der transduzierten L1236- und L540-Zellen blieben nahezu unverändert (Abbildung 3.2.7-27).



L428 pVIG-IRES		L428 SOCS3	
Zellzyklusphasen		Zellzyklusphasen	
subG1	3%	subG1	50%
G0/G1	43%	G0/G1	20%
S	20%	S	15%
G2/M	22%	G2/M	9%

L1236 pVIG-IRES		L1236 SOCS3	
Zellzyklusphasen		Zellzyklusphasen	
subG1	5%	subG1	6%
G0/G1	43%	G0/G1	42%
S	21%	S	24%
G2/M	19%	G2/M	16%

L540 pVIG-IRES		L540 SOCS3	
Zellzyklusphasen		Zellzyklusphasen	
subG1	6%	subG1	5%
G0/G1	49%	G0/G1	37%
S	24%	S	20%
G2/M	12%	G2/M	15%

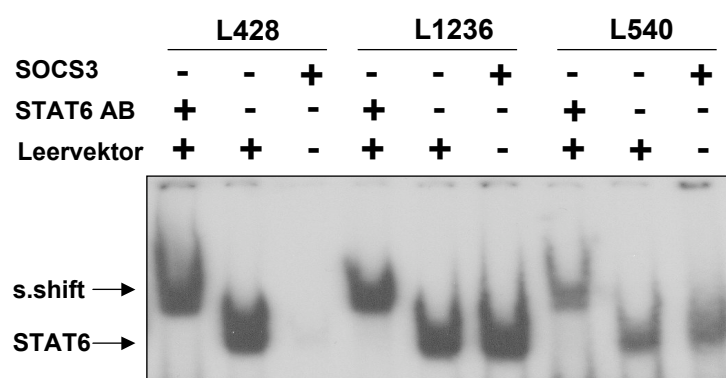
### Abbildung 3.2.7-27 Einfluss von SOCS3 auf das Zellzyklusprofil von HL-Zelllinien

96 Stunden nach der Transduktion wurden SOCS3- und Kontrollvektor- (pVIG-IRES) transduzierte L428-, L1236- und L540-Zellen fixiert und mit dem DNA-Farbstoff Propidiumjodid gefärbt. Ein entsprechendes Zellzyklusprofil wurde im FACS-Gerät aufgezeichnet. Eine prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus ist in der Tabelle dargestellt.

### 3.2.8 Einfluss von SOCS3 auf die STAT6-Aktivierung in HL-Zelllinien

Aus der Literatur ist bekannt, dass überexprimiertes SOCS1 nicht nur STAT3, sondern in einigen Zellmodellen (Fibroblasten aus Mäusembryonen) auch STAT6 hemmen kann (Sato *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass sowohl SOCS1 als auch SOCS3 die IL-4- und IL-13-vermittelte Phosphorylierung von STAT6 in HEK293-Zellen reduzierte (Hebenstreit *et al.*,

2005). Um festzustellen ob die Induktion von Apoptose in den L428-Zellen nach SOCS3-Überexpression ausschließlich auf die Hemmung von STAT3 zurückzuführen ist, wurde der Einfluss von SOCS3 auf die STAT6-Aktivität untersucht. Dazu wurden Gelretardierungsexperimente mit einem radioaktiv markierten STAT6/DNA-Bindeelement aus dem C $\epsilon$ -Keimbahn-Promotor durchgeführt. Wie in Abbildung 3.2.8-28 deutlich zu sehen ist, hemmte die Überexpression von SOCS3 die STAT6/DNA-Bindung in L428-Zellen nahezu vollständig. In den L1236- und L540-Zellen blieb die STAT6-Aktivität nahezu unbeeinflusst. Aufgrund dieser Erkenntnisse lässt sich schlussfolgern, dass die Induktion von Apoptose in den L428-Zellen nicht lediglich auf eine Hemmung von STAT3 zurückgehen muss. Es könnte sich vielmehr um die Kombination aus STAT3- und STAT6-Hemmung handeln. Andererseits scheinen STAT3 und STAT6 in den L1236- und L540-Zellen durch Kinasen aktiviert zu sein, die nicht sensitiv für eine Hemmung durch die SOCS-Proteine sind.

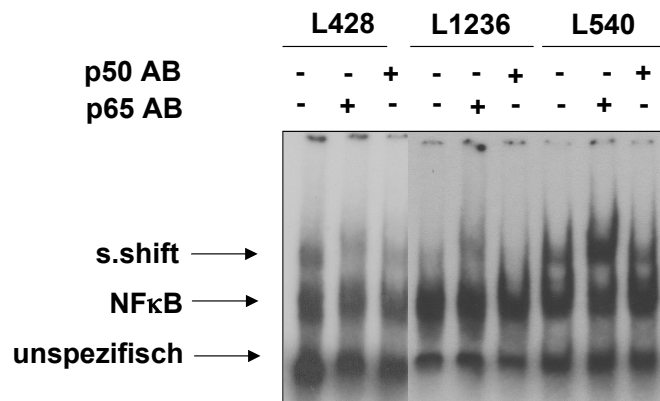


### 3.2.8-28 Einfluss von SOCS3 auf die STAT6/DNA-Bindung in HL-Zelllinien

SOCS3 wurde in L428-, L1236- und L540-Zellen mit Hilfe von Lentiviren überexprimiert. Die Transduktionseffizienz wurde im FACS-Gerät getestet. Als Kontrolle wurde der Leervektor (pVIG-IRES) verwendet. 72 Stunden nach der Transduktion wurden Gesamtzellextrakte (WCE) präpariert. 8  $\mu$ g WCE-Extract wurden mit einem radioaktiv markierten STAT6/DNA-Bindeelement (C $\epsilon$ -Keimbahn) inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Komplexzusammensetzung wurde durch Zugabe eines STAT6-spezifischen Antikörpers (AB) bestimmt (s.shift). Der STAT6/DNA-Komplex ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

### 3.2.9 Einfluss von SOCS3 auf die Aktivität von NFκB

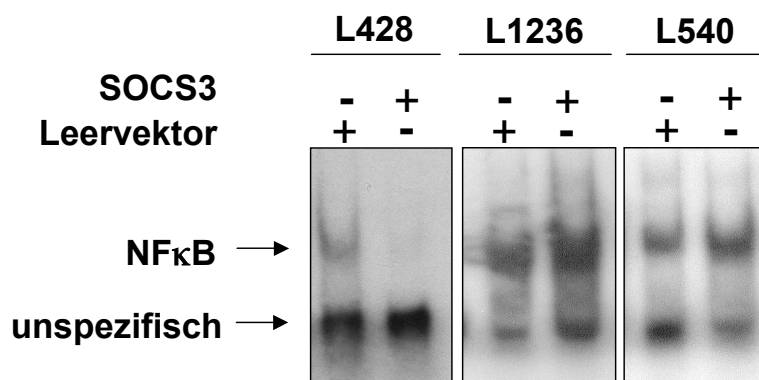
HL-Zelllinien, sowie Primärzellen und HL-Biopsien sind durch konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB gekennzeichnet (Bargou *et al.*, 1997). Mehrere Publikationen konnten bereits zeigen, dass NFκB eine maßgebliche Rolle für die Proliferation und das Überleben von HL-Zellen spielt (Hinz *et al.*, 2002). Des Weiteren ist in der Literatur beschrieben, dass SOCS1 den proteasomalen Abbau von p65, einer Untereinheit von NFκB, reguliert (Ryo *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, ob SOCS3 in HL-Zelllinien einen Einfluss auf NFκB hat, wurden Gelretardierungsexperimente mit einem NFκB/DNA-Bindungselement durchgeführt. Abbildung 3.2.9-29 gibt zunächst einen Überblick über die NFκB-Aktivität in den L428-, L1236- und L540-Zellen. Um die Zusammensetzung des NFκB-Komplexes zu bestimmen, wurden die Gesamtzellextrakte mit p65- und p50-Antikörpern inkubiert. p65 und p50 gehören zu den Hauptuntereinheiten von NFκB. Sie können sowohl Homo-, als auch Heterodimere bilden. In Abbildung 3.2.9-29 ist zu erkennen, dass der NFκB-Komplex in allen drei Zelllinien hauptsächlich p65 enthält.



**Abbildung 3.2.9-29 NFκB/DNA-Bindung in HL-Zelllinien**

Gesamtzellextrakte (8 µg WCE) der verschiedenen HL-Zelllinien wurde mit einem radioaktiv markierten NFκB/DNA-Bindungselement inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zusammensetzung der Komplexe wurde durch Inkubation mit Antikörpern, die spezifische NFκB-Untereinheiten (p50, p65) erkennen, bestimmt. Zugabe eines spezifischen Antikörpers (AB) resultiert in einem Komplex mit geringerer Mobilität (s.shift). Der untere Komplex blieb auch nach Antikörperzugabe unverändert und wurde daher als unspezifisch deklariert.

Die NF $\kappa$ B-Aktivierung in den L1236- und L540-Zellen ist vergleichbar und wesentlich stärker als in den L428-Zellen. In allen Zelllinien war zusätzlich zu dem NF $\kappa$ B-Komplex noch ein weiterer Komplex mit größerer Mobilität detektierbar. Dieser Komplex konnte allerdings nicht durch Zugabe eines p65- oder p50-Antikörpers zurückgehalten werden. Das schließt jedoch nicht aus, dass dieser Komplex aus anderen NF $\kappa$ B-Untereinheiten (z.B. p52/RelB) besteht. Zur Untersuchung des Einflusses von SOCS3 auf NF $\kappa$ B wurden Gesamtzellextrakte (WCE) von SOCS3- und Leervektor-transduzierten L428-, L1236- und L540-Zellen präpariert und mit einem radioaktiv markierten NF $\kappa$ B/DNA-Bindungselement inkubiert. Das Ergebnis eines solchen Gelretardierungsexperimentes ist in Abbildung 3.2.9-30 dargestellt.



### 3.2.9-30 Einfluss von SOCS3 auf die DNA-Bindung von NF $\kappa$ B in HL-Zelllinien

SOCS3 wurde in den L428-, L1236- und L540-Zellen über ein lentivirales Expressionssystem überexprimiert. Als Kontrolle wurde der Leervektor (pVIG-IRES) verwendet. Die Transduktionseffizienzen wurden mittels Ko-Expression von GFP im FACS-Gerät überprüft. 72 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen für Gesamtzellextrakte (WCE) geerntet. 8  $\mu$ g Extrakt wurden mit einem radioaktiv markierten NF $\kappa$ B-Bindungselement inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Der NF $\kappa$ B/DNA-Komplex ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

In den L428-Zellen wurde die NF $\kappa$ B/DNA-Bindung durch die Überexpression von SOCS3 gehemmt, während in den L1236-Zellen, sowie den L540-Zellen keine Hemmung von NF $\kappa$ B durch SOCS3 detektiert werden konnte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Induktion von Apoptose in den L428-Zellen möglicherweise auf die kombinierte Hemmung von STAT3, STAT6 und NF $\kappa$ B zurückzuführen ist.

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Bedeutung der STAT-Proteine im klassischen Hodgkin-Lymphom

Das klassische Hodgkin-Lymphom (HL) ist charakterisiert durch einkernige Hodgkin- und mehrkernige Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen). Dabei repräsentieren die malignen Zellen nur ca. 1% der Zellen des Tumors. Umgeben sind die HRS-Zellen von einem Infiltrat aus T-Zellen, eosinophilen Zellen und Plasmazellen. Ein wichtiges Kennzeichen dieses Lymphoms ist die autokrine bzw. parakrine Sekretion verschiedener Zytokine (z.B. IL-6, IL-13) (Skinnider *et al.*, 2001b; Kube *et al.*, 2001). Diese deregulierte Sekretion von Botenstoffen trägt wahrscheinlich zur konstitutiven Aktivierung verschiedener Signalwege bei. Dazu gehören z.B. c-JUN und JUNB (Mathas *et al.*, 2002), AKT (Morrison *et al.*, 2004), MEK/ERK (Zheng *et al.*, 2003), NOTCH1 (Jundt *et al.*, 2002) oder der JAK/STAT-Signalweg (Kube *et al.*, 2001) (Skinnider *et al.*, 2002a). Solche konstitutiv aktivierten Signalkaskaden können als Anhaltspunkte für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien dienen.

Obgleich bei der Behandlung des klassischen Hodgkin-Lymphoms mit konventioneller Chemo- oder Strahlentherapie immer weitere Fortschritte gemacht werden, sind häufig schwere Nebenerkrankungen die Folge. Aus diesem Grund besteht vor allem für die Behandlung des Hodgkin-Lymphoms die Notwendigkeit alternativer Strategien, welche die molekularen Ursachen der Erkrankung berücksichtigen. In diesem Zusammenhang sind bereits einige Gene bekannt, die mit dem malignen Phänotyp der Erkrankung assoziiert sind und Grundlage für therapeutische Ansätze darstellen. Dazu gehören neutralisierende Antikörper, die gezielt gegen Proteine oder Rezeptoren gerichtet sind, die anti-apoptotische und proliferations-fördernde Signale vermitteln. Sie umfassen anti-TRAIL-R1-Antikörper, anti-CD20- (Rituximab), anti-CD30-Antikörper (SGN-30, MDX-60) aber auch anti-IL-13-Antikörper (CAT-354). Auch Substanzen, welche die NF $\kappa$ B-Signalkaskade inhibieren (Arsentrioxid, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) erweisen sich im HL-Zellmodell als vielversprechend. Einen anderen Ansatz liefern Inhibitoren des 26S-Proteasoms über das z.B. der NF $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B abgebaut wird (Bortezomib, MG132) (Re *et al.*, 2005).

---

Inwieweit die JAK/STAT-Signalkaskade an der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms beteiligt ist und sich als Angriffspunkt für zukünftige therapeutische Ansätze eignet, ist noch unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung einzelner Mitglieder der JAK/STAT-Signalkaskade für die Entstehung des klassischen Hodgkin-Lymphoms zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Aktivierung, sowie die Gesamtexpression von STAT1, 3, 5 und 6 in fünf verschiedenen Zelllinien des klassischen Hodgkin-Lymphoms mit Hilfe von Gelretardierungsexperimenten (EMSA) und Western Blot Analysen getestet. Diese Untersuchungen zeigten vergleichbare Mengen an STAT5A, STAT5B und STAT6 in allen getesteten Zelllinien (Abbildung 3.1.1-4). Unterschiede wurden bei der Aktivierung von STAT1, 3, 5 und 6 im EMSA gefunden (Abbildung 3.1.1-1-3). Aktiviertes STAT1, 3, 5, 6 wurde auch schon in HL-Biopsien detektiert (Garcia *et al.*, 2003). Unsere Ergebnisse bestätigen diese Beobachtungen. Die Funktion von STAT3 bei der Regulation der Proliferation ist in einigen Tumorzelllinien bereits diskutiert worden (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Kube *et al.*, 2001; Burke *et al.*, 2001; Alas *et al.*, 2003; Amin *et al.*, 2004). Große Mengen an aktiviertem STAT3 wurden auch in HL-Zelllinien (L428, L540, HDLM2) gefunden (Abbildung 3.2.1-1). Andere Gruppen bestätigten diese Beobachtungen (Kube *et al.*, 2001; Holtick *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass STAT3 im klassischen Hodgkin-Lymphom ein wichtiger Regulator der Proliferation sein könnte. STAT3 wird unter anderem durch IL-6 aktiviert. Obwohl einige HL-Zelllinien durch autokrine bzw. parakrine Sekretion von IL-6 gekennzeichnet sind, hatte ein neutralisierender Antikörper gegen IL-6 keinen Einfluss auf die Aktivierung von STAT3 (Kube *et al.*, 2001). Das heißt in diesen Zellen scheint STAT3 IL-6-unabhängig aktiviert zu werden.

STAT1 und STAT3 werden häufig durch die gleichen Zytokine aktiviert, haben aber eher gegensätzliche Funktionen (Bromberg *et al.*, 1999; Bromberg, 2002). Welche Bedeutung dabei das Verhältnis von STAT1 und STAT3 bei der Regulation zellulärer Funktionen hat, ist noch unklar. STAT3 ist als Onkogen beschrieben (Bromberg *et al.*, 1999). Es fördert die Proliferation und inhibiert Apoptose in Tumorzellen. STAT1 hat eher die Funktion eines Tumorsuppressors. Es inhibiert die Proliferation und induziert Apoptose in einigen Tumorzellen (Bromberg *et al.*, 1996; Stephanou *et al.*, 2003). Dennoch



---

wird die Rolle von STAT1 bei der Tumorentstehung kontrovers diskutiert. So konnte in einigen Tumorzellen auch konstitutiv aktives STAT1 nachgewiesen werden (Bowman *et al.*, 2000; Buettner *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2004). Andererseits weist der Verlust von STAT1 im Magenkrebs, in T-Zelllymphomen und Melanomen auf eine pro-apoptotische Funktion hin (Wong *et al.*, 1997; Pansky *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde konstitutiv aktives STAT1 in einer HL-Zelllinie (L1236) detektiert (Abbildung 3.1.1-1 und 3.1.1-4). Starke DNA-Bindung von STAT5 konnte in L540- und HDLM2-Zellen im EMSA gezeigt werden (Abbildung 3.1.1-2). Phosphoryliertes STAT5 wurde zusätzlich auch in L428-Zellen im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.1.1-4). STAT5/DNA-Bindung wurde in diesen Zellen nicht detektiert. Ein Grund dafür ist, dass auch STAT6 an das Konsensuselement aus dem verwendeten  $\beta$ -Kasein-Promotor bindet und damit wahrscheinlich die schwächere STAT5/DNA-Bindung verdeckt (Abbildung 3.1.1-2). In einigen HL-Zelllinien konnte STAT5 als Zielgen von NF $\kappa$ B identifiziert werden (Hinz *et al.* 2002).

In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten wurde in vier von fünf Zelllinien aktiviertes STAT6 gefunden (Abbildung 3.1.1-3 und 3.1.1-4) (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2001a; Trieu *et al.*, 2004). STAT6 vermittelt in der Zelle IL-4- und IL-13-induzierte Signale. Verschiedene Gruppen konnten bereits zeigen, dass IL-13 in HRS-Zellen häufig autokrin oder parakrin sekretiert wird (Skinnider *et al.*, 2001b). Diese permanente Sekretion könnte für die konstitutive Aktivierung von STAT6 in diesen Zellen verantwortlich sein. Dabei korrelieren IL-13-Sekretion und STAT6-Aktivierung aber nicht in jedem Fall miteinander. So wurde z.B. im Überstand der KMH2-Zellen die größte Menge an IL-13 im ELISA gemessen, obwohl in diesen Zellen keine aktivierten STATs gefunden wurden (Abbildung 3.1.1-1 bis Abbildung 3.1.1-4) (Skinnider *et al.*, 2002b). In den gleichen Zellen hatte ein neutralisierender IL-13-Antikörper keinen Einfluss auf die Proliferation dieser Zellen. Dies deutet darauf hin, dass deren Wachstum IL-13-unabhängig ist (Skinnider *et al.*, 2002b).

---

Zusammenfassend weisen diese Unterschiede in der STAT-Aktivierung auf unterschiedliche Funktionen bei der Regulation zellulärer Prozesse, sowie beim Aktivierungsmechanismus hin.

#### **4.2 Einfluss von synthetischen Inhibitoren auf die JAK/STAT-Signalkaskade**

Um die Bedeutung der STAT-Proteine für zelluläre Prozesse im klassischen Hodgkin-Lymphom zu untersuchen, wurden zwei verschiedene JAK-Kinaseinhibitoren eingesetzt. Das Tyrphostin AG490 ist bereits sehr gut charakterisiert und wurde schon erfolgreich zur Hemmung von konstitutiv aktivem STAT3 in verschiedenen Zellsystemen eingesetzt (Meydan *et al.*, 1996; Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Burke *et al.*, 2001; Kube *et al.*, 2001). Als zweiter Inhibitor wurde Cucurbitacin I verwendet. Diese Substanz ist als spezifischer Inhibitor für JAK2/STAT3-vermittelte Signale beschrieben (Blaskovich *et al.*, 2003).

Der Einfluss der beiden Substanzen auf die Aktivierung von STAT1, 3 und 6 wurde zunächst im Gelaretdierungsexperiment untersucht (Abbildung 3.1.2-5). Dabei zeigte sich, dass AG490 die STAT3/DNA-Bindung in L428-, L540- und HDLM2-Zellen hemmte, aber keinen Einfluss auf die DNA-Bindung von STAT1 in den L1236-Zellen hatte. Zusätzlich blockierte AG490 die STAT6/DNA-Bindung in zwei HL-Zelllinien vollständig (L540, HDLM2) (Abbildung 3.1.2-5, B). Cucurbitacin I hemmte die STAT6/DNA-Bindung in allen Zelllinien. Ebenso wurde die STAT1- und STAT3/DNA-Bindung mit einer Ausnahme (L428) inhibiert (Abbildung 3.1.2-5, A). Immunfärbungen zeigten, dass auch aktiviertes STAT5 durch beide Inhibitoren vollständig gehemmt wurde (Abbildung 3.1.2-6 A und B). Des Weiteren zeigten die Western Blot-Analysen aber auch Unterschiede zu den EMSA-Experimenten. In den L1236-Zellen wurde die STAT1-Aktivierung durch AG490 und nicht durch Cucurbitacin I gehemmt wie im EMSA. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 nicht zwingend notwendig ist für eine DNA-Bindung. Hinweise darauf finden sich auch in der Literatur. So konnte gezeigt werden, dass nicht-phosphoryliertes STAT1 in den Kern wandert und dort an

---

eine Promotorsequenz des LMP2-Gens bindet (Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000). Ebenso zeigte sich, dass Cucurbitacin I in den L428-Zellen zwar die Phosphorylierung von STAT3 effizient hemmte, aber kaum Einfluss auf die DNA-Bindung hatte. Somit scheint auch für STAT3 eine Tyrosin-Phosphorylierung für eine DNA-Bindung nicht zwingend notwendig zu sein. Ähnliche Beobachtungen machten Yang *et al.*, die zeigen konnten, dass nicht-phosphoryliertes STAT3 die Expression bestimmter Gene regulieren kann (Yang *et al.*, 2005). Um Erkenntnisse über den Aktivierungsmechanismus der STAT-Moleküle zu erlangen, wurde der Einfluss von AG490 und Cucurbitacin I auf die JAK2-Kinase getestet. Diese Kinase ist häufig verantwortlich für die Aktivierung der STAT-Moleküle. Die JAK2-Kinase wurde allerdings nur in zwei HL-Zelllinien (L428, HDLM2) aktiviert vorgefunden. In diesen Zelllinien wurde die Aktivierung von JAK2 durch beide Inhibitoren gehemmt (Abbildung 3.1.2-6). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die JAK2-Kinase nicht für die Aktivierung der STATs in den verbleibenden Zelllinien (L1236, L540) verantwortlich sein kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass STAT-Proteine auch durch andere Kinasen aktiviert werden können. Dazu gehören z.B. die ALK-Kinase, die STAT3 im anaplastischen großzelligen Lymphom (anaplastic large cell lymphom) aktiviert (Amin *et al.*, 2004). Diese Kinase kommt für das klassische Hodgkin-Lymphom wahrscheinlich nicht in Frage, da eine Expression der ALK-Kinase in HL-Zellen bisher nicht nachgewiesen wurde (Waggott *et al.*, 1997). In anderen Zellsystemen ist eine konstitutive Aktivierung von STAT3 mit der SRC-Kinase assoziiert (Garcia *et al.*, 2001). Eine konstitutive Aktivierung von STAT5 kann, z. B. im hämatopoetischen System, durch Translokationsprodukte wie BCR-ABL hervorgerufen werden (Sternberg *et al.*, 2004). Für das klassische Hodgkin-Lymphom ist die aberrante Expression von verschiedenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bekannt (Renne *et al.*, 2005). Möglicherweise sind einige dieser Kinasen für die konstitutive Aktivierung der STATs verantwortlich. Konkrete Hinweise dafür stehen noch aus. In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Inhibitoren auf die Proliferation der HL-Zelllinien getestet. In allen verwendeten Zelllinien wurde das Wachstum der HL-Zellen durch beide Inhibitoren gehemmt. Diese Proliferationshemmung ließ jedoch zunächst keine Rückschlüsse zu, ob die Zellen starben oder aufgrund eines Zellzyklusarrestes in ihrer Proliferation gehemmt waren. Eine Zellzyklusanalyse zeigte, dass

---

Cucurbitacin I bei einer längeren Behandlung (72h) den Anteil toter Zellen (subG1-Phase) in allen vier HL-Zelllinien deutlich erhöhte (Tabelle 3.1.2.2-1). AG490 war am effektivsten in den L540-Zellen und den HDLM2-Zellen. In den L428- und L1236-Zellen erhöhte eine Behandlung (24h) mit dem Tyrphostin AG490 die Anzahl an Zellen im G0/G1-Bereich. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine Verminderung der Zellzahl nicht in allen Zelllinien auf eine Erhöhung der Anzahl toter Zellen zurückzuführen war. Am effizientesten waren beide Inhibitoren in den L540-Zellen. In dieser Zelllinie wurden auch die größten Mengen an aktivierten STATs nachgewiesen. Die Untersuchungen mit den synthetischen Inhibitoren haben gezeigt, dass der JAK/STAT-Signalweg ein wichtiger Regulator für die Proliferation und das Überleben der HL-Zellen darstellt. Dennoch lässt sich die Bedeutung einzelner STAT-Mitglieder nicht erfassen, da die Kinase-Blocker in jeder HL-Zelllinie immer mehr als nur ein STAT-Protein gehemmt haben. Um die Funktion einzelner STAT-Mitglieder genauer zu untersuchen, wurden daher spezifische siRNAs eingesetzt, die gezielt einzelne STAT-Proteine hemmen.

#### **4.3 Die Bedeutung von STAT3 in HL-Zelllinien**

Um die Funktion von STAT3 bei der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms genauer zu untersuchen, wurde eine STAT3-spezifische siRNA (small interfering RNA) verwendet. Mittels lentiviraler Vektoren wurde diese siRNA in verschiedenen HL-Zelllinien exprimiert (L428, L1236, L540). Als Kontrolle diente in diesem Zusammenhang entweder der Leervektor (pVIG) oder eine unspezifische siRNA (scramble). Obwohl alle Zelllinien ausreichend transduziert waren (Abbildung 3.1.3-8), konnte die STAT3-Expression nur in einer Zelllinie (L1236) effizient gehemmt werden (Abbildung 3.1.3-9). Eine Analyse der DNA-Sequenz gegen die die siRNA gerichtet war, ergab in den L428- und L540-Zellen keinen Hinweis auf Punktmutationen in diesem Bereich, so dass eine verminderte Übereinstimmung der Sequenz als Grund für die mangelnde siRNA-Effizienz auszuschließen war (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise war die große Menge an aktiviertem STAT3 in den L428- und L540-Zellen ein Grund für die verbleibende starke Expression von STAT3 auch nach siRNA-

---

Expression. Es wäre ebenso möglich, dass unterschiedliche RNA- bzw. Protein-Stabilitäten zu den unterschiedlichen Effizienzen beigetragen haben.

Die Hemmung von STAT3 in den L1236-Zellen reichte aus, um die Proliferation dieser Zelllinie zu hemmen (Abbildung 3.1.3.1-10). Eine anschließende Zellzyklusanalyse der STAT3-siRNA-transduzierten L1236-Zellen zeigte eine erhöhte Anzahl an Zellen mit fragmentierter DNA (Abbildung 3.1.3.2-11). Dass es sich dabei um apoptotische Zellen handelte, wurde mit Hilfe des pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK bestätigt (Abbildung 3.1.3.2-11). Somit ließ sich feststellen, dass STAT3 in den L1236-Zellen ein wichtiger Faktor für die Proliferation und das Überleben der Zellen darstellte. Dabei könnte das Verhältnis von aktiviertem STAT1 und STAT3 in den L1236-Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose spielen, da nur in diesen Zellen konstitutiv aktiviertes STAT1 gefunden wurde. Die Menge an aktiviertem STAT1 könnte eine pro-apoptotische Funktion von STAT1 im Falle einer Hemmung von STAT3 noch verstärken. Hinweise, welche die Bedeutung von STAT3 als Regulator von Proliferation und Überleben von HL-Zellen untermauern, finden sich auch in der Literatur (Kube *et al.*, 2001; Holtick *et al.*, 2005). Holtick *et al.* konnten zeigen, dass eine Hemmung von STAT3 mittels spezifischer siRNA die Proliferation der L428-Zellen hemmte (Holtick *et al.*, 2005). Auch für andere Tumorzellsysteme, wie z.B. Brustkrebs und Prostatakrebs, aber auch für multiple Myelome, konnte bereits gezeigt werden, dass STAT3 in diesen Zellen durch Expression anti-apoptotischer Proteine (z.B. Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Survivin) das Überleben sichert (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Burke *et al.*, 2001).

---

#### 4.4 Die Bedeutung von STAT6 in HL-Zelllinien

In Übereinstimmung mit verschiedenen Publikationen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass STAT6 in Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms konstitutiv aktiv vorliegt (Abbildung 3.1.1-3) (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2002b). Auch in mehr als 75% aller HL-Biopsien wurde konstitutiv aktives STAT6 nachgewiesen (Skinnider *et al.*, 2002b). Obgleich diese Beobachtungen darauf hindeuten, dass STAT6 eine wichtige Funktion im klassischen Hodgkin-Lymphom hat, ist diese bisher noch nicht bewiesen. Die Bedeutung von STAT6 in HL-Zelllinien wurde mit Hilfe einer STAT6-spezifischen siRNA untersucht. Durch lentivirale Expression dieser siRNA konnte die STAT6-Expression in den L428- und L1236-Zellen effizient gehemmt werden. In den L540-Zellen wurde die Expression von STAT6 nicht vollständig inhibiert (Abbildung 3.1.4-13). Untersuchungen der Proliferation von STAT6-siRNA-exprimierenden Zellen zeigten deutlich eine Hemmung des Wachstums in den L1236-Zellen. Die Proliferation von L428- und L540-Zellen blieb durch die Hemmung von STAT6 unverändert (Abbildung 3.1.4.1-14). Eine Zellzyklusanalyse zeigte zudem einen deutlich erhöhten Anteil an STAT6-siRNA-exprimierenden L1236-Zellen mit fragmentierter DNA (subG1-Bereich). Die Zellzyklusprofile der transduzierten L428- und L540-Zellen blieben unverändert (Abbildung 3.4.2.15). STAT6 vermittelt in der Zelle IL-4- und IL-13-induzierte Signale. Es ist zwar bekannt, dass eine Hemmung des IL-13-Rezeptors mit einem löslichen IL-13-Decoy-Rezeptor in einigen HL-Zelllinien (L428, HDLM2) Apoptose auslöst (Trieu *et al.*, 2004), aber diese Daten geben keinerlei Aufschluss darüber, ob die Induktion der Apoptose ausschließlich auf die Hemmung von STAT6 zurückgeht. Neben STAT6 können Komponenten des IL-13-Rezeptors in B-Zellen zusätzlich auch STAT3 und STAT5 aktivieren (Rolling *et al.*, 1996). Aus diesem Grund lässt sich die Induktion von Apoptose durch eine Blockade des IL-13-Rezeptors nicht auf die alleinige Hemmung von STAT6 zurückführen, sondern könnte vielmehr das Resultat einer kombinierten Inhibition mehrerer Transkriptionsfaktoren sein. Mit Hilfe der STAT6-spezifischen siRNA konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die alleinige Hemmung von STAT6 ausreicht, um Apoptose zu induzieren. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, warum eine Inhibition von STAT6 nur in den L1236-Zellen Apoptose auslöste, nicht aber in den L428-

---

Zellen, zu mal die L428-Zellen nach Behandlung mit dem löslichen IL-13-Decoy-Rezeptor in Apoptose gehen (Trieu *et al.*, 2004). Zum einen könnte dies an der Menge an konstitutiv aktiviertem STAT1 liegen, das vielleicht, wie bereits vorne erwähnt, seine pro-apoptotische Wirkung nach STAT6-Depletion verstärkte. Zum anderen könnten aber auch die Zielgene, die von STAT6 reguliert werden, in beiden Zellsystemen unterschiedlich sein und damit auch unterschiedliche zelluläre Funktionen kontrollieren. Des Weiteren werden durch die Hemmung des IL-13-Rezeptors auch andere Signalvermittler blockiert, die wichtig für das Überleben der Zellen sein könnten (Rolling *et al.*, 1996).

Da die anti-apoptotische Wirkung von STAT6 in HL-Zellen bislang nicht bekannt war, ist auch der Mechanismus der Regulation noch nicht bekannt. Um diesen Mechanismus der STAT6-vermittelten anti-apoptotischen Wirkung genauer zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener Apoptose-relevanter Proteine im Western Blot untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Apoptose-Induktion nach STAT6-Depletion durch Caspasen (Caspase-3, -8, -9) vermittelt wurde (Abbildung 3.1.4.3-16). Obwohl c-Flip als anti-apoptotisch wirkendes Protein mit dem malignen Phänotyp des klassischen Hodgkin-Lymphoms in Verbindung gebracht wird, blieb dessen Expression unverändert (Mathas *et al.*, 2004). Ebenso unverändert blieb die Expression eines weiteren anti-apoptotischen Proteins: Bcl-2. Dennoch ist weiterhin unklar, wie die Expression und Aktivierung von STAT6 Apoptose in HL-Zelllinien verhindert. Um diesen Mechanismus genauer zu untersuchen und um Zielgene von STAT6 zu identifizieren, die anti-apoptotisch wirken, wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann, Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main, wurde eine Genexpressionsanalyse von STAT6-siRNA-exprimierenden L1236-Zellen erstellt („Human Genome Survey Microarray V2.0“, Applied Biosystems). Mit Hilfe dieses Arrays wurden insgesamt 653 Gene identifiziert, die unterschiedlich reguliert waren und einen „Fold-Change“ von mehr als zwei aufwiesen (Ausschnitt in Tabelle 3.1.4.4-2). Dabei wurden die meisten Gene von STAT6 reprimiert. Betrachtet man die biologischen Funktionen dieser Gene, dann sind sowohl Gene vertreten, die in die Regulation der Apoptose (c-Flip, Trail, Xaf1) und des Zellzyklus (p21, Cdc14, Cdk6) eingreifen, aber auch solche, die mit Chemotaxis (Ccl7) und Angiogenese (E-Cadherin, Lpxn) assoziiert sind. Dabei

---

treten zum Teil Unterschiede bei der Expression auf RNA- und Protein-Ebene auf. So wurde z.B. die Expression von c-Flip durch die STAT6-siRNA im Array auf RNA-Ebene induziert, während die Expression auf Protein-Ebene jedoch unverändert blieb. Am stärksten induziert waren Gene, die eine Interferon-induzierte Zellantwort vermitteln (OAS1, Trim22, STAT1) (Bromberg *et al.*, 1996; Gongora *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2005). Dies deutet zunächst auf die Induktion einer unspezifischen Immunantwort durch die Transduktion oder die siRNA-Expression selbst hin (McManus *et al.*, 2002; Brand *et al.*, 2005). Dagegen spricht allerdings, dass Interferon-vermittelnde Gene durch die Kontrollviren (scramble) nicht induziert wurden. Kürzlich wurde ein Zusammenhang zwischen Trim22 (STAF50) und p53 beschrieben, der darauf hinweist, dass Trim22 eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Leukämiezellen spielt (Obad *et al.*, 2004). Eine Induktion von Trim22 durch STAT6-Depletion konnte mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 3.1.4.5-17). Interessanterweise wurde auch die Expression der beiden Onkogene c-Myc und c-Myb durch Hemmung von STAT6 unterdrückt (Gewirtz, 1996; Greco *et al.*, 2001; Refaeli *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005). Eine Hemmung von c-Myc und c-Myb konnte ebenfalls mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 3.1.4.5-17). Microarray-Analysen mit L1236-Zellen, im Vergleich zu normalen B-Zellen der Keimzentren, zeigen eine aberrante Expression von l-myc in den HL-Zellen und stützen damit eine potentielle Bedeutung der Myc-Familie für die Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms (Schwering *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurden durch Hemmung von STAT6 Vertreter der Matrixmetalloproteasen (Adamts16, Adamts11) induziert. Diese Proteine sind an Proteolyse-, sowie Invasionsvorgängen in der Zelle beteiligt (Tang, 2001; White, 2003). Inwieweit es sich dabei um direkte Zielgene von STAT6 handelt, bedarf einer genaueren Analyse z.B. mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP). Dennoch konnten für einige Gene (Trim22, c-Myc, c-Myb) bereits potentielle STAT6-Bindestellen im Promotorbereich identifiziert werden (Frank Nonnenmacher, persönliche Mitteilung).



---

#### 4.5 Die Bedeutung von SOCS1 und SOCS3 im klassischen Hodgkin-Lymphom

Der JAK/STAT-Signalweg unterliegt normalerweise einer strikten negativen Regulation durch unterschiedliche Proteine. Dazu zählen auch die SOCS-Proteine (suppressor of cytokine signaling). SOCS1 und SOCS3 sind direkte Zielgene der STATs und inhibieren die Signalkaskade in einer negativen Rückkopplung (Starr *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1999). Dabei greifen die SOCS in unterschiedlichen Wirkmechanismen auf der Ebene der Kinasen ein und können somit verschiedene STATs, sowie andere Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Viele Krebsarten sind gekennzeichnet durch fehlende oder fehlerhaft exprimierte SOCS-Proteine (Galm *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Melzner *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2005). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Expression von SOCS1 durch Methylierung, z.B. in multiplen Myelomen oder im Leberkarzinom, gestört ist (Galm *et al.*, 2003; Yoshikawa *et al.*, 2001). Ermöglicht man in diesen Zellen eine SOCS1-Expression durch transiente Transfektion, gehen diese Zellen in Apoptose (Yoshikawa *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde die Expression eines N-terminalverkürzten SOCS3 beschrieben, dass aufgrund eines fehlenden Ubiquitinilierungssignals nicht mehr abgebaut werden kann und damit funktionslos ist (Sasaki *et al.*, 2003).

Die Aktivierung der SOCS-Proteine erfolgt normalerweise transient durch die gleichen Zytokine, die auch die STATs aktivieren (Starr *et al.*, 1999; Alexander *et al.*, 2004). Eine autokrine/parakrine Sekretion von IL-6 und IL-13 und infolgedessen eine konstitutive Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade ist bereits für das klassische Hodgkin-Lymphom beschrieben (Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002b). Die Auswirkungen auf die SOCS-Expression sind jedoch unklar und wurden in dieser Arbeit erstmals untersucht. Innerhalb der SOCS-Familie sind SOCS1 und SOCS3 als Regulatoren von STAT3 beschrieben. Aus der Literatur ist aber auch bekannt, dass sowohl SOCS1, als auch SOCS3 die IL-4- und IL-13-induzierte Aktivierung von STAT6 in HEK293-Zellen reduzieren (Hebenstreit *et al.*, 2005). Deshalb wurde zunächst die endogene Menge von SOCS1 und SOCS3 in den verschiedenen HL-Zelllinien mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dabei wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien detektiert. In den L428-Zellen wurde am wenigsten

---

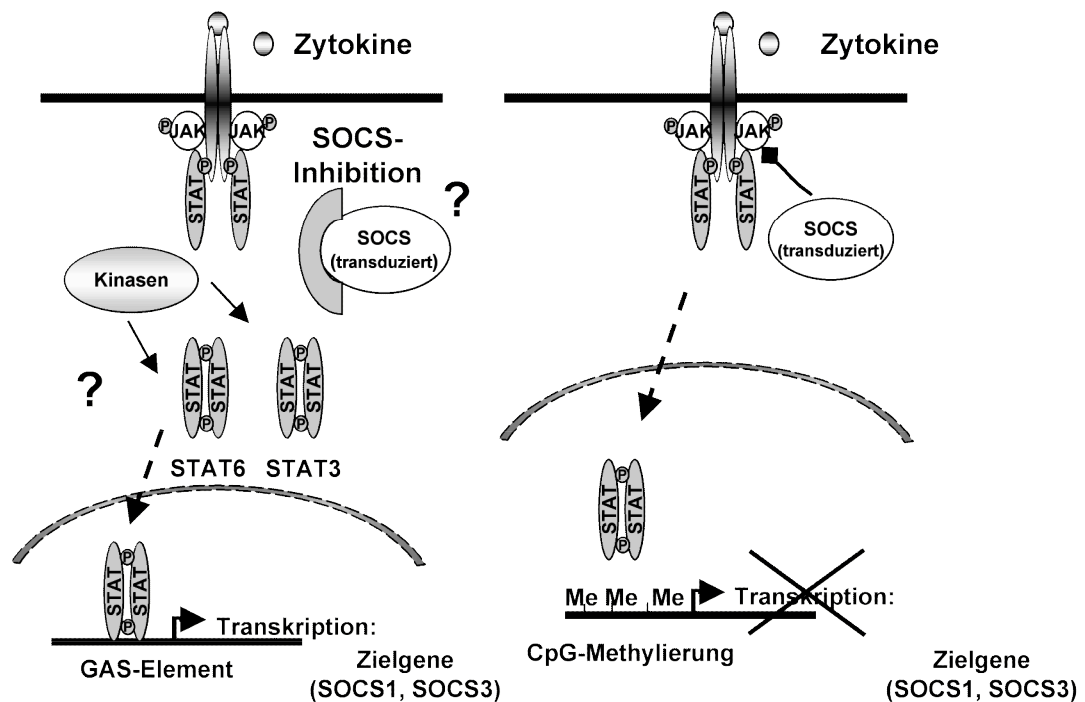
SOCS1 und SOCS3 nachgewiesen (Abbildung 3.2.1-18). In diesen Zellen könnte die SOCS-Expression, wie auch schon für multiple Myelome beschrieben, durch eine Methylierung unterdrückt sein (Galm *et al.*, 2003) (Abbildung 4.4-1). Am meisten SOCS1 und SOCS3 exprimierten die L540-Zellen. In dieser Zelllinie waren auch die STAT-Proteine am stärksten aktiviert (Abbildung 3.1.1-4). Dies deutet zwar darauf hin, dass die SOCS-Proteine direkte Zielgene der STATs darstellen, aber sie können die Aktivierung der STAT-Proteine nicht inhibieren. Möglicherweise sind die SOCS-Proteine aufgrund einer Mutation nicht mehr funktionell (Melzner *et al.*, 2005) oder die Menge der SOCS-Proteine reicht nicht aus, um die große Menge aktivierter STATs zu inhibieren (Cho-Vega *et al.*, 2004). In mediastinalen B-Zelllymphomen wurden Mutationen in der SOCS-Box von SOCS1 gefunden, die zu einem Funktionsverlust von SOCS1 führten (Melzner *et al.*, 2005). Andererseits wurde in anaplastischen großzelligen Lymphomen (anaplastic large cell lymphoma) zwar SOCS3-Expression nachgewiesen, diese reichte jedoch nicht aus, um die konstitutive STAT-Aktivierung zu inhibieren (Cho-Vega *et al.*, 2004). SOCS1 und SOCS3 wurden allerdings auch in den KMH2-Zellen detektiert, obgleich in dieser Zelllinie die STAT-Proteine nicht aktiviert waren. Dies weist darauf hin, dass möglicherweise andere Signalwege die SOCS-Expression regulieren. In diesem Zusammenhang ist eine EGF-abhängige Aktivierung von SOCS5 beschrieben worden (Kario *et al.*, 2005).

Insgesamt waren die Expressionslevel von SOCS1 deutlich niedriger als die Expressionslevel von SOCS3 (Abbildung 3.2.1-18). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann, Pathologie Universitätsklinikum Frankfurt am Main, wurde die SOCS1- und SOCS3-Expression in HL-Biopsien untersucht. Bei diesen immunhistochemischen Färbungen zeigte sich, dass SOCS1 in keiner HL-Biopsie nachgewiesen werden konnte. Im Falle von SOCS3 exprimierten 33% der als nodulär sklerotisierend eingestuften HL-Biopsien, sowie 46% der gemischtzelligen HL-Biopsien, SOCS3 (Abbildung 3.2.2.-20). Zusätzliche Färbungen mit Phospho-Antikörpern detektierten in den gleichen HL-Biopsien auch aktiviertes STAT3 und aktiviertes STAT6 (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf zwei unterschiedliche Regulationsmechanismen hin.

---

Im ersten Fall exprimieren die Zellen große Mengen an aktivierten STATs und gleichzeitig viel SOCS1 und SOCS3. In diesem Fall können die SOCS-Proteine die Menge an aktivierten STATs nicht inhibieren, da die STAT-Proteine möglicherweise durch SOCS-insensitive Kinasen aktiviert werden. Im zweiten Fall sind die Zellen gekennzeichnet durch starke Aktivierung der STAT-Proteine und geringe bis gar keine SOCS1- und SOCS3-Expression. In diesem Fall könnte die SOCS-Expression z.B. durch Methylierung im Promotorbereich gestört sein (Abbildung 4.4-1). Um diese Beobachtungen genauer zu untersuchen, wurden SOCS1 und SOCS3 in den L428-, L1236- und L540-Zellen überexprimiert. Dabei zeigte sich, dass Zellen die weniger SOCS exprimierten und gleichzeitig große Mengen aktivierte STAT-Proteine besaßen (L428), sensitiv für eine Negativregulation durch SOCS1 und SOCS3 waren. In diesen Zellen hemmte SOCS3 nicht nur STAT3 (Abbildung 3.2.3-22, Abbildung 3.2.5-25), sondern auch STAT6 im Gelretardierungsexperiment (Abbildung 3.2.8-28). In den L428-Zellen resultierte eine Hemmung von STAT3 und STAT6 durch SOCS3 in einem Proliferationsarrest (Abbildung 3.2.6-26), sowie einer erhöhten Anzahl an Zellen im subG1-Bereich des Zellzyklusprofils (Abbildung 3.2.7-27). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung von STAT3 und STAT6, sowie das Wachstum der L428-Zellen von einem SOCS-regulierten Mechanismus abhängen. In Zellen, in denen mehr endogenes SOCS1 und SOCS3 nachweisbar war (L1236, L540), hatte eine Überexpression von SOCS keinen Effekt auf die STAT3- und STAT6/DNA-Bindung (Abbildung 3.2.5-25 und Abbildung 3.2.8-28) und ebenso keinen Einfluss auf die Proliferation und den Zellzyklus (Abbildung 3.2.6-26 und Abbildung 3.2.7-27). Es traten Unterschiede zwischen dem retro- und lentiviralen Expressionssystem in den L1236-Zellen auf. Die retrovirale Überexpression von SOCS3 hatte keinen Einfluss auf die STAT1/DNA-Bindung in diesen Zellen (Abbildung 3.2.3-22). Eine lentivirale Überexpression von SOCS3 dagegen hemmte die STAT1/DNA-Bindung in den L1236 Zellen (Abbildung 3.2.5-25). Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Promotoren in beiden Systemen zurückzuführen. Die Hemmung von STAT1 hatte aber keinen Einfluss auf die Proliferation und den Zellzyklus in den L1236-Zellen (Abbildung 3.2.6-26 und Abbildung 3.2.7-27). Zusammenfassend stützen diese Beobachtungen die Hypothese, dass Zellen, die bereits viel SOCS exprimieren,

die STAT-Proteine durch einen SOCS-insensitiven Mechanismus aktivieren (Abbildung 4.4-1). Das heißt die Aktivierung der STATs erfolgt nicht durch die JAK2-Kinase. Dies wurde auch schon durch die Studien mit den Inhibitoren belegt. In diesem Zusammenhang wurde aktivierte JAK2-Kinase nur in den L428- und HDLM2-Zellen gefunden. Somit haben die SOCS-Proteine durch Negativregulation dieser Kinase auch Einfluss auf die STAT-Aktivierung in den L428-Zellen. In den L1236- und L540-Zellen wurde keine aktivierte JAK2-Kinase nachgewiesen. Wahrscheinlich erfolgt in diesen Zellen die Aktivierung der STATs durch eine Kinase, die nicht der Negativregulation durch die SOCS-Proteine unterliegt.



#### Abbildung 4.4-1 Modell einzelner JAK/STAT-Komponenten im klassischen Hodgkin-Lymphom

Das Modell stellt Möglichkeiten dar, wie HL-Zellen einer Negativregulation durch die SOCS-Proteine entgehen könnten.

Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass die SOCS-Proteine auch andere Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Dazu gehört auch NF $\kappa$ B. Es wurde der proteasomale Abbau von p65, einer NF $\kappa$ B-Untereinheit, durch SOCS1 beschrieben (Ryo *et al.*, 2003). Konstitutiv aktiviertes NF $\kappa$ B spielt auch in Zellen

---

des klassischen Hodgkin-Lymphoms eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation. Mit Hilfe adenoviral-vermittelter Expression des NF $\kappa$ B-Superrepressors I $\kappa$ B $\Delta$ N konnte gezeigt werden, dass NF $\kappa$ B ein wichtiger Überlebensfaktor in einigen HL-Zelllinien ist (L428, HDLM2) (Hinz *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde konstitutiv aktives NF $\kappa$ B, in allen getesteten Zelllinien (L428, L1236, L540) gefunden. Die Komplexe bestanden zum größten Teil aus p65-Untereinheiten (Abbildung 3.2.9-29). Gelretardierungsexperimente haben gezeigt, dass SOCS3 in den L428-Zellen die DNA-Bindung von NF $\kappa$ B inhibierte (Abbildung 3.2.9-30). Die NF $\kappa$ B/DNA-Bindung in den L1236- und L540-Zellen blieb unbeeinflusst (Abbildung 3.2.9-30). Somit könnte die Hemmung der Proliferation und das Absterben der L428-Zellen auf die kombinierte Hemmung von STAT3, STAT6 und NF $\kappa$ B zurückgehen. Betrachtet man diese Faktoren einzeln, so lässt sich schlussfolgern, dass eine Inhibition von STAT6 alleine nicht ausreicht, um das Wachstum der L428-Zellen zu inhibieren. Dies wurde mit Hilfe der STAT6-spezifischen siRNA gezeigt (Abbildung 3.1.4.1-14). Für STAT3 lässt sich bisher diese Schlussfolgerung nicht ziehen, da die STAT3-siRNA, die in dieser Arbeit verwendet wurde, die Gesamtmenge an STAT3 in den L428-Zellen nicht ausreichend inhibierte (Abbildung 3.1.3-9). Holtick *et al.* konnten jedoch zeigen, dass eine Depletion von STAT3 das Wachstum der L428-Zellen hemmte (Holtick *et al.*, 2005). Für NF $\kappa$ B konnten bereits Hinz *et al.* nachweisen, dass eine Hemmung von NF $\kappa$ B in den L428-Zellen ausreichte, um Apoptose zu induzieren (Hinz *et al.*, 2002).

Ziel dieser Arbeit war es im Rahmen des JAK/STAT-Signalweges die Bedeutung einzelner Komponenten dieser Kaskade für die Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms zu untersuchen und damit neue Ziele für therapeutische Ansätze zu definieren. In diesem Zusammenhang wurde die Funktion von STAT3 und STAT6 als anti-apoptotische, proliferations-fördernde Regulatoren zellulärer Prozesse identifiziert. Diese Erkenntnisse basieren auf der gezielten sequenz-spezifischen Inhibition (siRNA) der einzelnen Proteine. Somit konnte gezeigt werden, dass STAT3 ähnlich wie in anderen Tumorzellsystemen ein wichtiger Regulator von Proliferation und Apoptose in HL-Zellen ist. Darüber hinaus, konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die alleinige Hemmung von STAT6, als Vermittler IL-13-induzierter Signale ausreicht, um in einigen HL-Zellen Apoptose auszulösen. STAT3 und STAT6

---

stellen damit potentielle Angriffspunkte für therapeutische Ansätze im klassischen Hodgkin-Lymphom dar.

Neben der gezielten Blockade einzelner Proteine wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, dass die Negativregulatoren SOCS1 und SOCS3 eine zentrale Rolle in der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms spielen. Durch Expression von SOCS1 und SOCS3 in Zellen in denen wenig oder mutierte endogene SOCS vorhanden sind, können somit zelluläre Prozesse, wie Proliferation und Apoptose, wieder reguliert werden. Im Unterschied zur sequenz-spezifischen Blockade einzelner STATs wirken die SOCS-Proteine auf Ebene der Kinasen und sind damit in der Lage mehrere Transkriptionsfaktoren gleichzeitig zu inhibieren. Eine Überexpression der SOCS in HL-Zelllinien, mit wenig endogenen SOCS-Proteinen, inhibierte die Proliferation und erhöhte signifikant die Anzahl toter Zellen. Darüber hinaus zeigte sich, dass die SOCS-Proteine signalweg-übergreifend nicht nur die JAK/STAT-Signalkaskade, sondern auch die NF $\kappa$ B-Signalkaskade inhibierten. Dies deutet darauf hin, dass die Negativregulatoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung des malignen Phänotyps der Erkrankung spielen und ebenfalls einen potentiellen Ansatz für therapeutische Strategien liefern. Dabei kann es von Vorteil sein auf Ebene der Kinasen einzugreifen und mehrere Transkriptionsfaktoren gleichzeitig zu blockieren.

---

## 5 Zusammenfassung

Hodgkin-Lymphom-Biopsien und abgeleitete Zelllinien sind charakterisiert durch die konstitutive Aktivität verschiedener Komponenten des JAK/STAT-Signalweges. Dennoch ist die Bedeutung dieser Signalvermittler für die Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms nicht vollständig geklärt.

Gegenstand dieser Arbeit war die Bedeutung der JAK/STAT-Signalkaskade, sowie insbesondere die zellulären Funktionen von STAT3 und STAT6 zu untersuchen. Zu diesem Zweck kamen zwei verschiedene synthetische Kinase-Inhibitoren (AG490, Cucurbitacin I) zum Einsatz. Beide Substanzen blockieren die Kaskade auf Ebene der Kinasen und sind als JAK2/STAT3-spezifische Inhibitoren beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit beiden Substanzen das Wachstum der malignen Zellen hemmte. Gelretardierungsexperimente ergaben jedoch, dass beide Inhibitoren in allen HL-Zelllinien immer mehr als nur ein STAT-Molekül hemmten. Somit konnte keine Aussage über die Bedeutung einzelner STATs getroffen werden. Um die zellulären Funktionen von STAT3 und STAT6 zu untersuchen wurden daher spezifische siRNAs mittels lentiviraler Vektoren exprimiert. Die Rolle von STAT3 bei der Entstehung verschiedenster Krebsarten ist bereits gut charakterisiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass STAT3 auch in HL-Zellen ein wichtiger Regulator von Proliferation und Apoptose ist. Darüber hinaus konnte auch STAT6 als Vermittler proliferations-fördernder, anti-apoptotischer Signale identifiziert werden. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine alleinige Hemmung von STAT6 ausreicht um Apoptose in einigen HL-Zellen auszulösen. Diese Induktion von Apoptose wurde durch Caspasen vermittelt. Um den genauen Mechanismus aufzuklären und um STAT6-Zielgene zu identifizieren, die anti-apoptotisch wirken, wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt.

Eine weitere Möglichkeit die Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade zu beeinflussen bieten die SOCS-Proteine. Diese sind direkte Zielgene der STATs und regulieren die Signalvermittlung in einer negativen Rückkopplung. In vielen unterschiedlichen Krebsarten ist diese Negativregulation ausgefallen oder fehlerhaft. Das kann zu einer konstitutiven Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges beitragen. Die Bedeutung der SOCS-Proteine im klassischen

---

Hodgkin-Lymphom ist noch unbekannt und wurde in dieser Arbeit untersucht. Es wurden unterschiedliche Mengen endogenes SOCS1 und SOCS3 in verschiedenen HL-Zelllinien und in HL-Biopsien detektiert. In Überexpressionsexperimenten mit SOCS1 und SOCS3 konnte gezeigt werden, dass sowohl SOCS1, als auch SOCS3 nur in Zellen, die wenig endogene SOCS besitzen, die Aktivität von STAT3 und STAT6 inhibieren konnten. Die Überexpression resultierte in einem Wachstumsarrest und einem erhöhten Anteil toter Zellen. In Zellen, die bereits viel SOCS besaßen, konnten weder STAT3 noch STAT6 inhibiert werden. In diesem Zusammenhang wurde ein Modell, das potentielle Möglichkeiten zum Umgehen einer Negativregulation durch die SOCS-Proteine darstellt, diskutiert. Darüber hinaus konnte in Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden, dass SOCS3 zusätzlich zu STAT3 und STAT6 in Zellen, die wenig SOCS besaßen, auch NFκB-Aktivierung hemmte. Da NFκB bereits als wichtiger Überlebensfaktor für HL-Zellen beschrieben wurde, trägt dessen Inhibition wahrscheinlich zu einer Hemmung des Wachstums bei.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit STAT3 und STAT6 als potentielle Ziele für therapeutische Ansätze für das klassische Hodgkin-Lymphom identifiziert werden. Einen weiteren Angriffspunkt für zukünftige Strategien liefern die SOCS-Proteine, die eine signalweg-übergreifende Hemmung von Transkriptionsfaktoren erlauben.



---

## 6 Literaturverzeichnis

- Abril E, Real LM, Serrano A, Jimenez P, Garcia A, Canton J, Trigo I, Garrido F and Ruiz-Cabello F (1998). Unresponsiveness to interferon associated with STAT1 protein deficiency in a gastric adenocarcinoma cell line. *Cancer Immunol Immunother*, 47, 113-120.
- Alas S and Bonavida B (2003). Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res*, 9, 316-326.
- Alexander WS and Hilton DJ (2004). The Role of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins in Regulation of the Immune Response
- Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 22, 503-529.
- Alvarez JV, Febbo PG, Ramaswamy S, Loda M, Richardson A and Frank DA (2005). Identification of a genetic signature of activated signal transducer and activator of transcription 3 in human tumors. *Cancer Res*, 65, 5054-5062.
- Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, Lin Q, Fujio Y, Kunisada K, Leventaki V, Das P, Rassidakis GZ, Cutler C, Medeiros LJ and Lai R (2004). Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene*, 23, 5426-5434.
- Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C and Dorken B (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*, 100, 2961-2969.
- Barton BE, Karras JG, Murphy TF, Barton A and Huang HF (2004). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther*, 3, 11-20.

- 
- Bharti AC, Donato N and Aggarwal BB (2003).Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol*, 171, 3863-3871.
- Birnboim HC (1983).A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*, 100, 243-255.
- Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R and Sehti SM (2003).Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res*, 63, 1270-1279.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J and Jove R (2000).STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19, 2474-2488.
- Bradford MM (1976).A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brand S, Zitzmann K, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Vlotides G, Eichhorst ST, Goke B, Diepolder H and Auernhammer CJ (2005).SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochem Biophys Res Commun*, 331, 543-548.
- Brocke-Heidrich K, Kretzschmar AK, Pfeifer G, Henze C, Loffler D, Koczan D, Thiesen HJ, Burger R, Gramatzki M and Horn F (2004).Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood*, 103, 242-251. Epub 2003 Sep 2011.
- Brombacher F (2000).The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy. *Bioessays*, 22, 646-656.
- Bromberg J (2002).Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*, 109, 1139-1142.

---

Bromberg J and Darnell JE (2000).The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, 19, 2468-2473.

Bromberg JF (2001).Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*, 23, 161-169.

Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD and Darnell JE, Jr. (1996).Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7673-7678.

Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C and Darnell JE, Jr. (1999).Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98, 295-303.

Buettner R, Mora LB and Jove R (2002).Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 8, 945-954.

Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK and Lin J (2001).Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene*, 20, 7925-7934.

Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS and Jove R (1999).Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10, 105-115.

Chatterjee-Kishore M, Wright KL, Ting JP and Stark GR (2000).How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J*, 19, 4111-4122.

Chen CY, Tsay W, Tang JL, Shen HL, Lin SW, Huang SY, Yao M, Chen YC, Shen MC, Wang CH and Tien HF (2003).SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 37, 300-305.

- 
- Cheng HY, Li P, David M, Smithgall TE, Feng L and Lieberman MW (2004). Arsenic inhibition of the JAK-STAT pathway. *Oncogene*, 23, 3603-3612.
- Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, Dhall G, Zamo A, Raz R, Karras JG, Levy DE and Inghirami G (2005). Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med*, 11, 623-629.
- Cho-Vega JH, Rassidakis GZ, Amin HM, Tsioli P, Spurgers K, Remache YK, Vega F, Goy AH, Gilles F and Medeiros LJ (2004). Suppressor of cytokine signaling 3 expression in anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*, 18, 1872-1878.
- Cochet O, Frelin C, Peyron JF and Imbert V (2005). Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma-derived cell lines supports cell survival. *Cell Signal*.
- Coffer PJ, Koenderman L and de Groot RP (2000). The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene*, 19, 2511-2522.
- Conrad DJ and Lu M (2000). Regulation of human 12/15-lipoxygenase by Stat6-dependent transcription. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 22, 226-234.
- Darnell JE (1997). STATs and gene regulation. *Science*, 277, 1630-1635.
- Dorai T and Aggarwal BB (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett*, 215, 129-140.
- Drexler HG, Gaedicke G, Lok MS, Diehl V and Minowada J (1986). Hodgkin's disease derived cell lines HDLM-2 and L-428: comparison of morphology, immunological and isoenzyme profiles. *Leuk Res*, 10, 487-500.
- Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC and Levy DE (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*, 84, 443-450.

- 
- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, *et al.* (1997).A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387, 921-924.
- Falini B, Bigerna B, Pasqualucci L, Fizzotti M, Martelli MF, Pileri S, Pinto A, Carbone A, Venturi S, Pacini R, Cattoretti G, Pescarmona E, *et al.* (1996).Distinctive expression pattern of the BCL-6 protein in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *Blood*, 87, 465-471.
- Fisher SG and Fisher RI (2004).The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*, 23, 6524-6534.
- Fouchier RA, Meyer BE, Simon JH, Fischer U and Malim MH (1997).HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *Embo J*, 16, 4531-4539.
- Galm O, Yoshikawa H, Esteller M, Osieka R and Herman JG (2003).SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood*, 101, 2784-2788. Epub 2002 Nov 2727.
- Gao LF, Xu DQ, Wen LJ, Zhang XY, Shao YT and Zhao XJ (2005).Inhibition of STAT3 expression by siRNA suppresses growth and induces apoptosis in laryngeal cancer cells. *Acta Pharmacol Sin*, 26, 377-383.
- Garcia JF, Camacho FI, Morente M, Fraga M, Montalban C, Alvaro T, Bellas C, Castano A, Diez A, Flores T, Martin C, Martinez MA, *et al.* (2003).Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood*, 101, 681-689. Epub 2002 Sep 2012.
- Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, *et al.* (2001).Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 20, 2499-2513.

- 
- Garcia R, Yu CL, Hudnall A, Catlett R, Nelson KL, Smithgall T, Fujita DJ, Ethier SP and Jove R (1997).Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ*, 8, 1267-1276.
- Gewirtz AM (1996).The c-myb proto-oncogene: a novel target for human gene therapy. *Cancer Treat Res*, 84, 93-112.
- Gleave ME and Monia BP (2005).Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, 5, 468-479.
- Gongora C, Tissot C, Cerdan C and Mechti N (2000).The interferon-inducible Staf50 gene is downregulated during T cell costimulation by CD2 and CD28. *J Interferon Cytokine Res*, 20, 955-961.
- Greco C, Alvino S, Buglioni S, Assisi D, Lapenta R, Grassi A, Stigliano V, Mottolese M and Casale V (2001).Activation of c-MYC and c-MYB proto-oncogenes is associated with decreased apoptosis in tumor colon progression. *Anticancer Res*, 21, 3185-3192.
- Grimley PM, Dong F and Rui H (1999).Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 10, 131-157.
- Guiter C, Dusanter-Fourt I, Copie-Bergman C, Boulland ML, Le Gouvello S, Gaulard P, Leroy K and Castellano F (2004).Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*, 104, 543-549 Epub 2004 Mar 2025.
- Hanahan D (1983).Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580.
- Hanahan D and Weinberg RA (2000).The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Harris CC (1996).p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17, 1187-1198.

- 
- He B, You L, Uematsu K, Zang K, Xu Z, Lee AY, Costello JF, McCormick F and Jablons DM (2003).SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14133-14138. Epub 12003 Nov 14114.
- Hebenstreit D, Luft P, Schmiedlechner A, Duschl A and Horejs-Hoeck J (2005).SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IL-4 and IL-13 induced activation of Eotaxin-3/CCL26 gene expression in HEK293 cells. *Mol Immunol*, 42, 295-303.
- Hennighausen L, Robinson GW, Wagner KU and Liu X (1997).Developing a mammary gland is a stat affair. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2, 365-372.
- Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dorken B, Zenke M, Stein H and Scheidereit C (2002).Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med*, 196, 605-617.
- Holtick U, Vockerodt M, Pinkert D, Schoof N, Sturzenhofecker B, Kussebi N, Lauber K, Wesselborg S, Loffler D, Horn F, Trumper L and Kube D (2005).STAT3 is essential for Hodgkin lymphoma cell proliferation and is a target of tyrphostin AG17 which confers sensitization for apoptosis. *Leukemia*, 19, 936-944.
- Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y, Saito I, Higashihara M, Mori S and Kadin ME (2002).Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene*, 21, 2493-2503.
- Huang M, Dorsey JF, Epling-Burnette PK, Nimmanapalli R, Landowski TH, Mora LB, Niu G, Sinibaldi D, Bai F, Kraker A, Yu H, Moscinski L, *et al.* (2002).Inhibition of Bcr-Abl kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of Stat5 and growth of CML cells. *Oncogene*, 21, 8804-8816.
- Izban KF, Ergin M, Huang Q, Qin JZ, Martinez RL, Schnitzer B, Ni H, Nickoloff BJ and Alkan S (2001).Characterization of NF-kappaB expression in Hodgkin's

- 
- disease: inhibition of constitutively expressed NF-kappaB results in spontaneous caspase-independent apoptosis in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod Pathol*, 14, 297-310.
- Jackson PK (2001).A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev*, 15, 3053-3058.
- Jaffe ES, Harris NL, Diebold J and Muller-Hermelink HK (1999).World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am J Clin Pathol*, 111, S8-12.
- Jarrett RF and MacKenzie J (1999).Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol*, 36, 260-269.
- Ji JD, Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Lee YH, Cheon HJ, Sohn J and Song GG (2005).Inhibition of IL-10-induced STAT3 activation by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2. *Rheumatology (Oxford)*, 44, 983-988.
- Jing N and Tweardy DJ (2005).Targeting Stat3 in cancer therapy. *Anticancer Drugs*, 16, 601-607.
- Jundt F, Anagnostopoulos I, Forster R, Mathas S, Stein H and Dorken B (2002).Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 99, 3398-3403.
- Kacha AK, Fallarino F, Markiewicz MA and Gajewski TF (2000).Cutting edge: spontaneous rejection of poorly immunogenic P1.HTR tumors by Stat6-deficient mice. *J Immunol*, 165, 6024-6028.
- Kanzler H, Hansmann ML, Kapp U, Wolf J, Diehl V, Rajewsky K and Kuppers R (1996).Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood*, 87, 3429-3436.



- 
- Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST and Grusby MJ (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, 4, 313-319.
- Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Kagi D, Ho A, Hessel A, Tipsword M, Williams A, Mirtsos C, Itie A, Moyle M, *et al.* (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med*, 189, 1939-1946.
- Kario E, Marmor MD, Adamsky K, Citri A, Amit I, Amariglio N, Rechavi G and Yarden Y (2005). Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem*, 280, 7038-7048.
- Kieslinger M, Woldman I, Moriggl R, Hofmann J, Marine JC, Ihle JN, Beug H and Decker T (2000). Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev*, 14, 232-244.
- Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Lee YH, Cheon H, Um JW, Sohn J, Song GG and Ji JD (2005). 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2 inhibits IL-6-induced Stat3 phosphorylation in lymphocytes. *Exp Mol Med*, 37, 179-185.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J and Schindler CW (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285, 1-24.
- Konnikova L, Kotecki M, Kruger MM and Cochran BH (2003). Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer*, 3, 23.
- Krebs DL and Hilton DJ (2001). SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, 19, 378-387.
- Kube D, Holtick U, Vockerodt M, Ahmadi T, Haier B, Behrmann I, Heinrich PC, Diehl V and Tesch H (2001). STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*, 98, 762-770.

- 
- Kubo M, Hanada T and Yoshimura A (2003). Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol*, 4, 1169-1176.
- Kuppers R (2002). Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res*, 84, 277-312.
- Kuppers R and Hansmann ML (2005). The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 511-517.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee SO, Lou W, Qureshi KM, Mehraein-Ghomi F, Trump DL and Gao AC (2004). RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Prostate*, 60, 303-309.
- Levy DE and Darnell JE, Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 651-662.
- Linehan LA, Warren WD, Thompson PA, Grusby MJ and Berton MT (1998). STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J Immunol*, 161, 302-310.
- Ling X and Arlinghaus RB (2005). Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. *Cancer Res*, 65, 2532-2536.
- Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B and Hennighausen L (1995). Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8831-8835.
- Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A and Hennighausen L (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev*, 11, 179-186.

- 
- Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, Jundt F, Bommert K, Mechta-Grigoriou F, Stein H, Dorken B and Scheidereit C (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *Embo J*, 21, 4104-4113.
- Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, Hummel F, Wiesner B, Janz M, Jundt F, Hirsch B, Johrens-Leder K, Vornlocher HP, Bommert K, Stein H, *et al.* (2004). c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med*, 199, 1041-1052.
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T and Yokota T (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J*, 18, 4261-4269.
- McManus MT and Sharp PA (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, 3, 737-747.
- Melzner I, Bucur AJ, Bruderlein S, Dorsch K, Hasel C, Barth TF, Leithauser F and Moller P (2005). Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood*, 105, 2535-2542.
- Melzner I and Moller P (2003). Silencing of the SOCS-1 gene by CpG methylation? *Blood*, 102, 1554-1555; author reply 1555.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, *et al.* (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84, 431-442.
- Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A and Roifman CM (1996). Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature*, 379, 645-648.

- 
- Morrison JA, Gulley ML, Pathmanathan R and Raab-Traub N (2004). Differential signaling pathways are activated in the Epstein-Barr virus-associated malignancies nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*, 64, 5251-5260.
- Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F and Groner B (2004). The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. *Mol Cancer Res*, 2, 170-182.
- Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S and Kishimoto T (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387, 924-929.
- Nam S, Buettner R, Turkson J, Kim D, Cheng JQ, Muehlbeyer S, Hippe F, Vatter S, Merz KH, Eisenbrand G and Jove R (2005). Idirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5998-6003.
- Neel BG and Tonks NK (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 193-204.
- Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R and Yu H (1999). Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res*, 59, 5059-5063.
- O'Shea JJ, Gadina M and Schreiber RD (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, 109 Suppl, S121-131.
- Obad S, Brunnstrom H, Vallon-Christersson J, Borg A, Drott K and Gullberg U (2004). Staf50 is a novel p53 target gene conferring reduced clonogenic growth of leukemic U-937 cells. *Oncogene*, 23, 4050-4059.
- Onishi M, Nosaka T, Misawa K, Mui AL, Gorman D, McMahon M, Miyajima A and Kitamura T (1998). Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol*, 18, 3871-3879.

- 
- Ory DS, Neugeboren BA and Mulligan RC (1996).A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 11400-11406.
- Ostrand-Rosenberg S, Grusby MJ and Clements VK (2000).Cutting edge: STAT6-deficient mice have enhanced tumor immunity to primary and metastatic mammary carcinoma. *J Immunol*, 165, 6015-6019.
- Pansky A, Hildebrand P, Fasler-Kan E, Baselgia L, Ketterer S, Beglinger C and Heim MH (2000).Defective Jak-STAT signal transduction pathway in melanoma cells resistant to growth inhibition by interferon-alpha. *Int J Cancer*, 85, 720-725.
- Patel T, Gores GJ and Kaufmann SH (1996).The role of proteases during apoptosis. *Faseb J*, 10, 587-597.
- Re D, Thomas RK, Behringer K and Diehl V (2005).From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential. *Blood*, 105, 4553-4560.
- Reed JC (2000).Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157, 1415-1430.
- Refaeli Y, Field KA, Turner BC, Trumpp A and Bishop JM (2005).The protooncogene MYC can break B cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4097-4102.
- Renne C, Willenbrock K, Kuppers R, Hansmann ML and Brauninger A (2005).Autocrine and paracrine activated receptor tyrosine kinases in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*.
- Rolling C, Treton D, Pellegrini S, Galanaud P and Richard Y (1996).IL4 and IL13 receptors share the gamma c chain and activate STAT6, STAT3 and STAT5 proteins in normal human B cells. *FEBS Lett*, 393, 53-56.
- Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, Rottapel R, Yamaoka S and Lu KP (2003).Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell*, 12, 1413-1426.

- 
- Sasaki A, Inagaki-Ohara K, Yoshida T, Yamanaka A, Sasaki M, Yasukawa H, Koromilas AE and Yoshimura A (2003).The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6. *J Biol Chem*, 278, 2432-2436.
- Sato T, Saito R, Jinushi T, Tsuji T, Matsuzaki J, Koda T, Nishimura S, Takeshima H and Nishimura T (2004).IFN-gamma-induced SOCS-1 regulates STAT6-dependent eotaxin production triggered by IL-4 and TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 314, 468-475.
- Schindler CW (2002).Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest*, 109, 1133-1137.
- Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC and Schaper F (2000).SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem*, 275, 12848-12856.
- Schnell T, Foley P, Wirth M, Munch J and Uberla K (2000).Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther*, 11, 439-447.
- Schwering I, Brauninger A, Distler V, Jesdinsky J, Diehl V, Hansmann ML, Rajewsky K and Kuppers R (2003).Profiling of Hodgkin's lymphoma cell line L1236 and germinal center B cells: identification of Hodgkin's lymphoma-specific genes. *Mol Med*, 9, 85-95.
- Shankaranarayanan P, Chaitidis P, Kuhn H and Nigam S (2001).Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene. *J Biol Chem*, 276, 42753-42760.
- Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, *et al.* (1996).Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*, 380, 630-633.

- 
- Shuai K and Liu B (2003).Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 3, 900-911.
- Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Patterson B, Trumper L, Kapp U and Mak TW (2002a).Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99, 618-626.
- Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Trumper LH, von Bonin F, Kapp U, Patterson B, Snow BE and Mak TW (2001a).Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 97, 250-255.
- Skinnider BF, Kapp U and Mak TW (2001b).Interleukin 13: a growth factor in hodgkin lymphoma. *Int Arch Allergy Immunol*, 126, 267-276.
- Skinnider BF, Kapp U and Mak TW (2002b).The role of interleukin 13 in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 43, 1203-1210.
- Skinnider BF and Mak TW (2002c).The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99, 4283-4297.
- Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM and Kingsman AJ (1995).A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*, 23, 628-633.
- Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD and Gutkind JS (2003).Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res*, 63, 2948-2956.
- Starr R and Hilton DJ (1999).Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays*, 21, 47-52.

- 
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA and Hilton DJ (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387, 917-921.
- Stein H, Marafioti T, Foss HD, Laumen H, Hummel M, Anagnostopoulos I, Wirth T, Demel G and Falini B (2001). Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*, 97, 496-501.
- Stephanou A and Latchman DS (2003). STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *Int J Exp Pathol*, 84, 239-244.
- Sternberg DW and Gilliland DG (2004). The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. *J Clin Oncol*, 22, 361-371.
- Sun J, Blaskovich MA, Jove R, Livingston SK, Coppola D and Sebt SM (2005). Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene*, 24, 3236-3245.
- Sun WH, Pabon C, Alsayed Y, Huang PP, Jandeska S, Uddin S, Platanias LC and Rosen ST (1998). Interferon-alpha resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT1 expression. *Blood*, 91, 570-576.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T and Akira S (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3801-3804.
- Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T and Akira S (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*, 380, 627-630.
- Tang BL (2001). ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol*, 33, 33-44.
- Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G and Ihle JN (1998). Stat5a and Stat5b proteins have



---

essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 93, 841-850.

Thomas RK, Re D, Wolf J and Diehl V (2004).Part I: Hodgkin's lymphoma--molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol*, 5, 11-18.

Trieu Y, Wen XY, Skinnider BF, Bray MR, Li Z, Claudio JO, Masih-Khan E, Zhu YX, Trudel S, McCart JA, Mak TW and Stewart AK (2004).Soluble interleukin-13Ralpha2 decoy receptor inhibits Hodgkin's lymphoma growth in vitro and in vivo  
The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*, 64, 3271-3275.

Turkson J, Zhang S, Mora LB, Burns A, Sebti S and Jove R (2005).A novel platinum compound that inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells. *J Biol Chem*.

Turkson J, Zhang S, Palmer J, Kay H, Stanko J, Mora LB, Sebti S, Yu H and Jove R (2004).Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther*, 3, 1533-1542.

Uddin S, Hussain AR, Manogaran PS, Al-Hussein K, Plataniias LC, Gutierrez MI and Bhatia KG (2005).Curcumin suppresses growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma. *Oncogene*.

Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, Ram PA, Waxman DJ and Davey HW (1997).Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7239-7244.

Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ and Silvennoinen O (2002).Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol*, 22, 3316-3326.

Waggott W, Delsol G, Jarret RF, Mason DY, Gatter KC, Boultonwood J and Wainscoat JS (1997).NPM-ALK gene fusion and Hodgkin's disease. *Blood*, 90, 1712-1713.

- 
- Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, *et al.* (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, 10, 48-54.
- Weber A, Hengge UR, Bardenheuer W, Tischoff I, Sommerer F, Markwarth A, Dietz A, Wittekind C and Tannapfel A (2005). SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene*.
- Werner M, Kraunus J, Baum C and Brocker T (2004). B-cell-specific transgene expression using a self-inactivating retroviral vector with human CD19 promoter and viral post-transcriptional regulatory element. *Gene Ther*, 11, 992-1000.
- White JM (2003). ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 598-606.
- Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiriou I, Estcourt MJ, Hersey P, Tam ND, Edmondson S, Devenish RJ and Ralph SJ (1997). Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem*, 272, 28779-28785.
- Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE and Stark GR (2005). Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res*, 65, 939-947.
- Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN and Yoshimura A (1999). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J*, 18, 1309-1320.
- Yasunaga S, Yuyama N, Arima K, Tanaka H, Toda S, Maeda M, Matsui K, Goda C, Yang Q, Sugita Y, Nagai H and Izuhara K (2003). The negative-feedback regulation of the IL-13 signal by the IL-13 receptor alpha2 chain in bronchial epithelial cells. *Cytokine*, 24, 293-303.

- 
- Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC and Herman JG (2001).SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet*, 28, 29-35.
- Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Lerner AC, Carter-Su C, Schwartz J and Jove R (1995).Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science*, 269, 81-83.
- Yu H and Jove R (2004).The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*, 4, 97-105.
- Zhang J, Yang J, Roy SK, Tininini S, Hu J, Bromberg JF, Poli V, Stark GR and Kalvakolanu DV (2003).The cell death regulator GRIM-19 is an inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9342-9347.
- Zheng B, Fiumara P, Li YV, Georgakis G, Snell V, Younes M, Vauthey JN, Carbone A and Younes A (2003).MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood*, 102, 1019-1027 Epub 2003 Apr 1010.
- Zhu D, Qi CF, Morse HC, 3rd, Janz S and Stevenson FK (2005).Deregulated expression of the Myc cellular oncogene drives development of mouse "Burkitt-like" lymphomas from naive B cells. *Blood*, 105, 2135-2137.

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ATP	Adenosin Triphosphat
BrdU	5-Bromo-2'Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	complementary DNA
DBD	DNA-Bindedomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FACS	Fluorescence aquired cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fötales Kälberserum
GAS	$\gamma$ -activated sequeunce
GC	Germinal centre
GFP	Green fluorescent protein
GL	Germline
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
I $\kappa$ B	Inhibitor $\kappa$ B
IRES	Internal ribosomal entry site
JAK	Janus Kinase
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MHC	Major histocompatibility complex

---

MLV	Moloney murine leukemia virus
M	Mol
MAPK	Mitogen activated kinase
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NF $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumjodid
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
RLU	Relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
SFFV	Spleen focus forming virus
SDS	Natrium Dodecylsulfat
siRNA	Small inhibitory RNA
SH2	Src-Homology Domäne 2
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
WCE	Whole cell extract

---

## 8 Anhang

### 8.1 *Curriculum vitae*

Daniela Baus  
Dipl.-Ing. Biotechnologie  
Odenwaldstr.1  
60528 Frankfurt am Main

Geburtsdatum:	03. August 1976
Geburtsort:	Saarbrücken
Staatsangehörigkeit:	deutsch

#### **Schulische und universitäre Ausbildung**

1982-1986	Grundschule, Südschule St. Ingbert
1986-1995	Leibniz-Gymnasium St. Ingbert, Abschluss Abitur
1995-2001	Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin; Abschluss als Dipl.-Ing.
02/1997-04/1997	Industriepraktikum am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik; Abteilung: Mikro- Sensorsysteme bei Dr. Cornelia Blau
01/1999-05/1999	ERASMUS/SOKRATES-Stipendium im Rahmen einer Studienarbeit an der Napier- University, Edinburgh, UK, Thema: Development of biosensors for the detection

---

	of phenol based on genetically modified <i>Pseudomonas putida</i> bei Prof. Nick Christofi
03/2000-08/2000	studentische Hilfskraft am Robert-Koch-Institut Berlin; Projekt: Horizontaler Gentransfer
06/2000-09/2001	studentische Hilfskraft mit Lehraufgaben an der Technischen Universität Berlin; Institut für Biotechnologie, Abteilung: Chemisch- technische Analysen bei Prof. Roland Tressl
10/2000-07/2001	Diplomarbeit am Robert-Koch-Institut Berlin; Projektgruppe: Biologische Sicherheit, Thema: Inactivation of a DNA binding protein in <i>Mycobacterium bovis</i> with antisense RNA technique to accelerate growth bei Prof. Bernd Appel
01/2002-05/2002	wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) Marburg bei Prof. Rolf Müller
seit 05/2002	Promotion am Georg-Speyer-Haus, Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Frankfurt am Main, in der Arbeitsgruppe von Dr. Edith Pfitzner unter der Betreuung von Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Thema: Die Bedeutung des JAK/STAT- Signalweges für die Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms

---

## 8.2 Veröffentlichungen

Lewin A, Baus D, Freytag B, Eberth A, Appel B: Introduction of a plasmid encoding antisense-RNA of the gene for the mycobacterial DNA-binding protein into *M. bovis* BCG. 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Mycobacteriology 27-30, June 2004, Alghero-Sardinia, Italy.

Pfützner E, Kliem S, Baus D, Litterst CM: The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des.* 2004, 10 (23): 2839-50. Review.

Corvinus FM, Orth C, Morrigl R, Tsareva SA, Wagner S, Pfützner EB, Baus D, Kaufmann R, Huber LA, Zatloukal K, Beug H, Ohlschlager P, Schutz A, Halhuber KJ, Friedrich K: Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia.* 2005, Jun; 7 (6): 545-55.

Krämer OH, Baus D, Knauer S, Stein S, Jäger E, Stauber R, Grez M, Pfützner E, Heinzel T: Acetylation of STAT1 modulates NF $\kappa$ B activity. eingereicht

Baus D and Pfützner E: Specific function of STAT3, SOCS1 and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *Int J Cancer*, 2005. in Druck

Pfützner E, Nonnenmacher F, Baus D: Strategies for targeting the JAK/STAT signaling pathway in cancer therapy. Review. eingereicht



---

## Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Frau Dr. Edith Pfitzner für die Bereitstellung des Promotionsthemas, sowie die Möglichkeit diese Arbeit in ihrem Labor durchzuführen. Besonders bedanken möchte ich mich für ihre Betreuung, die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft und die Gelegenheit das Projekt selbstständig mitzugestalten.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz für ihre Betreuung, ihre Begutachtung und das Interesse an meiner Arbeit. Für die Bereitstellung des lentiviralen Vektors und der STAT3-siRNA bedanke ich mich bei Katja Brocke-Heidrich, Universitätsklinik Leipzig.

Ich danke meiner Arbeitsgruppe und allen ehemaligen Mitgliedern, nämlich Stefanie, Sinje, Frank, Claudia F., Anes, Sandra K., Frauke, Claudia L., Sandra B. für ein gutes Arbeitsklima, ihre große Hilfsbereitschaft und eine hervorragende Zusammenarbeit. Ganz besonders danke ich Marco für seine Unterstützung und seine hilfreichen Vorschläge beim Verfassen dieser Arbeit. Ich danke allen Kollegen im Georg-Speyer-Haus insbesondere Oliver Krämer für eine gute Zusammenarbeit, Stefan Stein für seine Hilfe mit den viralen Konstrukten, Martin Zoernig für sein Hilfe am FACS, Margot Landerz für die – nicht immer einfachen – Sequenzierungen der siRNAs, sowie Klaus Lehmen für seine Unterstützung bei diversen Computer-Problemen. Ausserdem möchte ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann, Pathologie der Universitätsklinikum Frankfurt, danken, nämlich Andreas Bräuninger, Christoph Renné, Mathias Frank, Claudia Döring, Yvonne Blum und Silke Schirrmacher für eine hervorragende Zusammenarbeit bei den Microarray-Analysen und den immunhistochemischen Färbungen.

Ganz besonders danke ich auch allen Freunden ausserhalb des Labors, meinem Freund Alex, meinem Bruder und meinen Eltern, die mich immer „seelisch unterstützt“ haben und ohne deren Beitrag diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.